

Universidad ORT Uruguay
Facultad de Ingeniería

Estudio de la vía gluconeogénica en vacas lecheras sometidas a dos estrategias de alimentación, durante la curva de lactancia.

Entregado como requisito para la obtención del título de Licenciado en Biotecnología.

Guillermo Cañibe - 197448

Tutor: Mercedes García-Roche

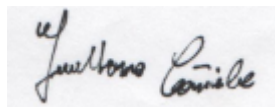
2019

Declaración de autoría

Yo, Guillermo Cañibe, declaro que el trabajo que se presenta en esta obra es de mi propia mano.

Puedo asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizaba el proyecto de grado de la carrera de Licenciatura en Biotecnología.
- Cuando he consultado el trabajo publicado por otros, lo he atribuido con claridad.
- Cuando he citado obras de otros, he indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente mía.
- En la obra, he acusado recibo de las ayudas recibidas.
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, he explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por mí.
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.

A handwritten signature in black ink that reads "Guillermo Cañibe". The signature is written in a cursive style and is centered on the page.

Guillermo Cañibe
Septiembre 2019.

Agradecimientos

Agradezco al Departamento de Producción animal y pasturas de la Facultad de Agronomía por la oportunidad de realizar este proyecto, por la confianza y por el apoyo recibido.

Particularmente a mi tutora Mercedes García-Roche, por su generosidad, su paciencia, su compromiso y su disposición a lo largo de este proyecto. Asimismo agradezco los conocimientos transmitidos tanto a nivel académico, como a nivel humano.

Resumen.

La lactancia temprana es un período de alta demanda energética para las vacas lecheras en donde se compromete la salud y consecuentemente su productividad. Los requerimientos de glucosa en este periodo se ven fuertemente elevados con el fin de alcanzar los niveles de producción de leche. Por este motivo consideramos relevante el estudio de la producción de glucosa en vacas lecheras de alta producción y el posible impacto de dos dietas.

Para este estudio utilizamos 24 vacas multíparas Holstein-Friesian asignadas en un diseño de bloques al azar a dos tratamientos: (TMR) alimentadas con dieta totalmente mezclada ad libitum, o (Pas) pastoreo más suplemento de 0 a 180 días posparto (DPP). Desde 180 DPP a 250 DPP ambos grupos fueron alimentados en pastoreo más suplemento. Se realizaron biopsias de hígado en 6 fechas representativas -14, +35, +60, +110, +180 y +250 DPP dentro de la curva de lactancia. Se determinaron los niveles hepáticos de glucosa libre y glucógeno utilizando kit comercial para las 6 fechas. Se estudió la activación de la vía de señalización de AMPK durante 35 y 250 DPP, mediante la técnica de western blot, a su vez se estudió un mecanismo de activación de la misma por medio de la expresión génica de receptores de adiponectina y leptina. Se estudió la implicancia de la activación de la vía de señalización de la AMPK en la vía gluconeogénica por medio de la expresión génica de 3 enzimas clave de la gluconeogénesis piruvato carboxilasa (PC), fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) y glucosa 6 fosfatasa (G6PC).

La glucosa libre en el hígado aumentó a 35 DPP, el glucógeno hepático disminuyó a los 35 DPP, aumentó durante lactancia media y volvió a caer a 250 DPP. El glucógeno hepático fue mayor para las vacas del grupo TMR que para las del grupo Pas. Se estudió la vía de señalización de AMPK, durante 35 y 250 DPP. Los resultados muestran que AMPK se encontraba más fosforilada en 35 DPP. No se encontró correlación entre los niveles de expresión de los receptores con la activación de AMPK. Para los niveles de ARNm de enzimas clave de la gluconeogénesis, hallamos un efecto de la fecha en todos los casos, mostrando una disminución en los niveles de ARNm durante 110 DPP. Se encontró una interacción entre DPP y tratamiento para la expresión génica de PC, indicando mayor expresión en el grupo Pas durante 35 DPP. Hallamos correlaciones significativas y positivas entre dichas enzimas ($r=0.5$) mostrando que la vía aumenta o disminuye su expresión según el momento de lactancia. Por último encontramos correlación negativa entre la fosforilación de AMPK y la expresión de PC, sugiriendo que esta vía de señalización podría tener un impacto sobre la expresión de esta enzima.

Palabras clave.

Hígado, gluconeogénesis, transición, expresión génica, nutrición, vía de señalización de AMPK, pastoreo vs. TMR.

Abreviaturas.

DPP: días post parto

TMR: total mixed ration.

PAS: pastura.

BEN: balance energético negativo

DEPC: pirocarbonato de dietilo

dNTP: desoxinucleótido trifosfato

DTT: ditioneitol

BSA: seroalbúmina bovina

mAb: anticuerpo monoclonal

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EGTA: ácido egtáxico

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

TBS: buffer tris salino

PBS: buffer fosfato salino

AMPK: AMP-activated protein kinase

ATP: adenosín trifosfato

AMP: adenosín monofosfato

ADP: adenosín difosfato

CaMKK2: calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa

PC: piruvato carboxilasa

G6P: glucosa 6 fosfatasa

PPAR-G: receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma

ObRb: receptor de leptina

ADIPOR1: receptor de adiponectina tipo 1

TAG: triacilglicéridos

AGV: ácidos grasos volátiles

Índice

1. Introducción	9
1.1 Industria lechera en Uruguay y sistemas de producción.....	9
1.2 Período de transición en la vaca lechera.....	10
1.3 La gluconeogénesis en rumiantes	12
1.3 Vía de señalización de la AMPK.....	14
2. Objetivos	17
2.1 Objetivo general:.....	17
2.2 Objetivos específicos:	17
3. Metodología	18
3.1 Declaración ética.....	18
3.2 Diseño experimental, manejo de animales y estrategias de alimentación.	18
3.3 Obtención de la muestra de tejido.....	21
3.4 Cuantificación de contenido de glucosa y glucógeno hepático.	21
3.4.1 Homogenizado de hígado para cuantificación de glucosa y glucógeno.....	21
3.4.2 Cuantificación de glucosa hepática libre.....	21
3.4.3 Cuantificación de glucógeno hepático.	21
3.5 Extracción de ARN.....	22
3.6 Precipitación con Cloruro de Litio.....	22
3.7 Tratamiento con DNasa.	23
3.8 Retrotranscripción.....	23
3.9 PCR en tiempo real.	23
3.10 Western Blot	24
3.10.1 Preparación de homogeneizados para Western Blot	24
3.10.2 Electroforesis.....	25
3.10.4 Detección de las proteínas.....	25

3.11 Análisis estadístico	25
4. Resultados Obtenidos.....	27
4.1 Composición hepática de glucosa y glucógeno durante la curva de lactancia.	27
4.2 Estudio de la vía de señalización de AMPK.....	29
4.3 Estudio de las implicancias de la activación de la vía de señalización de AMPK en la expresión de genes clave de la vía gluconeogénica.	35
5. Discusión.....	41
6. Conclusiones y trabajo a futuro.....	45
7. Referencias Bibliográficas.	47

1.Introducción

1.1 Industria lechera en Uruguay y sistemas de producción.

Desde la década del 70 Uruguay ha sufrido una transformación productiva del sector lácteo. El aumento sostenido de la producción le ha permitido a Uruguay colocarse hoy en día en el séptimo lugar dentro de los países exportadores mundiales de productos lácteos. Este aumento en la producción fue posible gracias a la incorporación de tecnologías y mayor conocimiento en el manejo de recursos, apoyado por políticas económicas sectoriales. En su conjunto, esta serie de factores permitieron aumentar la eficiencia de la producción por animal, y por unidad de tierra, es decir mayor producción por vaca, y aumento de la carga animal por hectárea (1).

El sistema de producción uruguayo, es fundamentalmente mixto: es decir de pastoreo directo, con suplementación. Estudios nacionales indican dietas de hasta un 70% de pastura. Los sistemas basados en pasturas presentan una serie de ventajas entre las que destacan, la disminución de costos, mejora en el bienestar animal y ser ambientalmente más amigables frente a los sistemas de dieta totalmente mezclada (TMR, por sus siglas en inglés). Sin embargo, también presenta desventajas como la dependencia del clima y la estacionalidad que determinan tanto la calidad como la cantidad de pastura disponible, lo que limita a su vez a tener pariciones estacionales. Asimismo, el sistema está influenciado por aspectos relacionados al comportamiento animal, que implican un gasto energético en actividad (pastoreo y caminata). Para sobrellevar estas deficiencias, se recurre al uso de suplementos concentrados y ensilajes (2).

Según surge de estudios nacionales recientes sobre la competitividad del sector lechero, nuestro sistema es deficitario en competitividad frente a sistemas similares (3). Una mejora en la eficiencia de los sistemas uruguayos deberá buscar incrementar la productividad y utilización de las pasturas y de las reservas forrajeras (4). En resumen, se debe buscar el máximo consumo posible de pastura y utilizar suplementos para alcanzar objetivos específicos como lo son el mantener o mejorar el estado corporal en épocas de limitaciones de pastura con el fin de mejorar el manejo reproductivo, aumentar la duración de la lactancia en épocas de limitaciones de pastura, y aumentar el contenido de proteína en leche (5).

A pesar de que el sistema de producción uruguayo sea mixto, el ganado lechero utilizado ampliamente es Holstein de genotipo norteamericano, este genotipo proviene de sistemas confinados, sistema no utilizado en el Uruguay. Los sistemas de producción de países del hemisferio norte se caracterizan por ser estabulados es decir en corrales dentro de galpones,

en donde los animales tienen acceso a alimento, sombra y agua ,y por una dieta TMR es decir diseñada a medida y balanceada en nutrientes. Esta dieta se basa en el uso de forraje, granos, concentrados proteicos, minerales y vitaminas, para alcanzar los requerimientos energéticos del animal. Este sistema de producción presenta una serie de ventajas, como un manejo del ganado más sencillo, sin depender de la pastura y condiciones ambientales, potencial de monitoreo individualizado del consumo, se minimiza la subnutrición y tiene la capacidad potencial de optimizar la digestión ruminal por un aporte uniforme de nutrientes a lo largo del tiempo (6). En su conjunto estas ventajas permiten expresar al máximo el potencial de producción de leche de las vacas Holstein de genotipo norteamericano, lo cual no se logra en nuestro sistema mixto. La desventaja de este sistema de producción es el costo asociado a la dieta, y la infraestructura necesaria como establos, maquinaria para preparar las dietas mezcladas (7). A partir de esta coyuntura se desprende la necesidad de estudiar e incorporar en cierta medida dietas totalmente mezcladas, en combinación con el pastoreo o durante ciertos períodos más exigentes para la vaca lechera, a modo de ejemplo.

1.2 Período de transición en la vaca lechera

En esta línea, está reportado que el período más demandante fisiológicamente es el “período de transición”, momento en el cual la vaca pasa de gestante no lactante a lactante no gestante, tres semanas antes y tres semanas después de la parición. En este período, se desarrollan los cambios fisiológicos más extremos en la vaca lechera de alta producción, tanto por una baja en el consumo debido a cambios hormonales fundamentalmente de la insulina y del factor de crecimiento insulínico tipo 1, así como por una multiplicación por cuatro de los requerimientos energéticos.(8)

Este periodo de transición es crítico para la salud del animal, se ve comprometida la productividad y la futura fertilidad de la vaca (9). En los primeros 60 días posparto (DPP, Fig. 1) la vaca alcanza el pico de producción de leche (línea negra), como no puede satisfacer sus necesidades energéticas con el consumo de materia seca (línea gris), del que logra alcanzar un pico recién a los 100 DPP recurre a la movilización de reservas corporales lipídicas, proteicas y minerales (línea punteada) que mediante una correcta alimentación durante lactancia media y comienzo de lactancia tardía podría eventualmente recomponerlas, previo al último tercio de gestación cuando comienzan los requerimientos del feto. Traduciendo este fenómeno a números, estudios muestran que en los primeros DPP se da un déficit del 26% en términos energéticos (10). Cuando se da este déficit energético, se habla de balance energético negativo (BEN). El desfasaje entre los requerimientos energéticos y el consumo está acrecentado por la selección genética realizada por el hombre han llevado a la vaca lechera a un desbalance metabólico en pro de un aumento de la producción de leche (11).

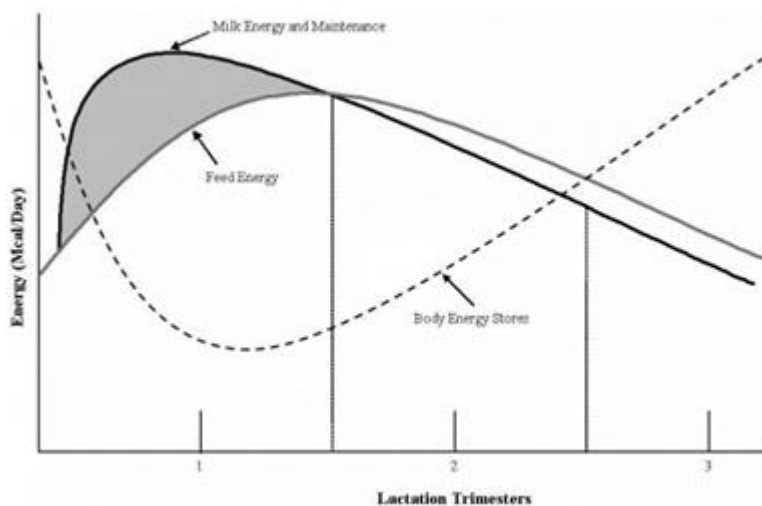


Fig. 1. Curva de lactancia. Gris oscuro representa el BEN. (12)

Asimismo, está demostrado que el ciclo productivo debe durar un año, es decir, un pico de producción por año para que este sistema de producción sea rentable. A su vez, como el sistema uruguayo de producción depende en hasta un 70% de la pastura, también se debe apuntar a la estacionalidad, es decir que las vacas paran cuando la disponibilidad y calidad de la pastura sea máxima, lo que sucede durante la primavera. Por esta razón, para garantizar esto, las vacas deben preñarse durante la lactancia temprana (primer trimestre esquematizado en la Fig.1). Sin embargo, estudios nacionales e internacionales han demostrado que la pérdida de condición corporal o status metabólico aumentan el período de anestro posparto, comprometiendo la productividad del siguiente ciclo productivo. Por esta razón, el problema del BEN no es únicamente un problema de salud animal, sino que también repercute en el sistema productivo como un todo.

Debido a que el precursor de la lactosa, componente osmótico que determinará la producción de leche es la glucosa, consideramos que es importante estudiar la producción de glucosa en vacas lecheras de alto potencial genético sometidas a un sistema mixto de producción (pastoreo más suplementación) o a una dieta totalmente mezclada.

1.3 La gluconeogénesis en rumiantes

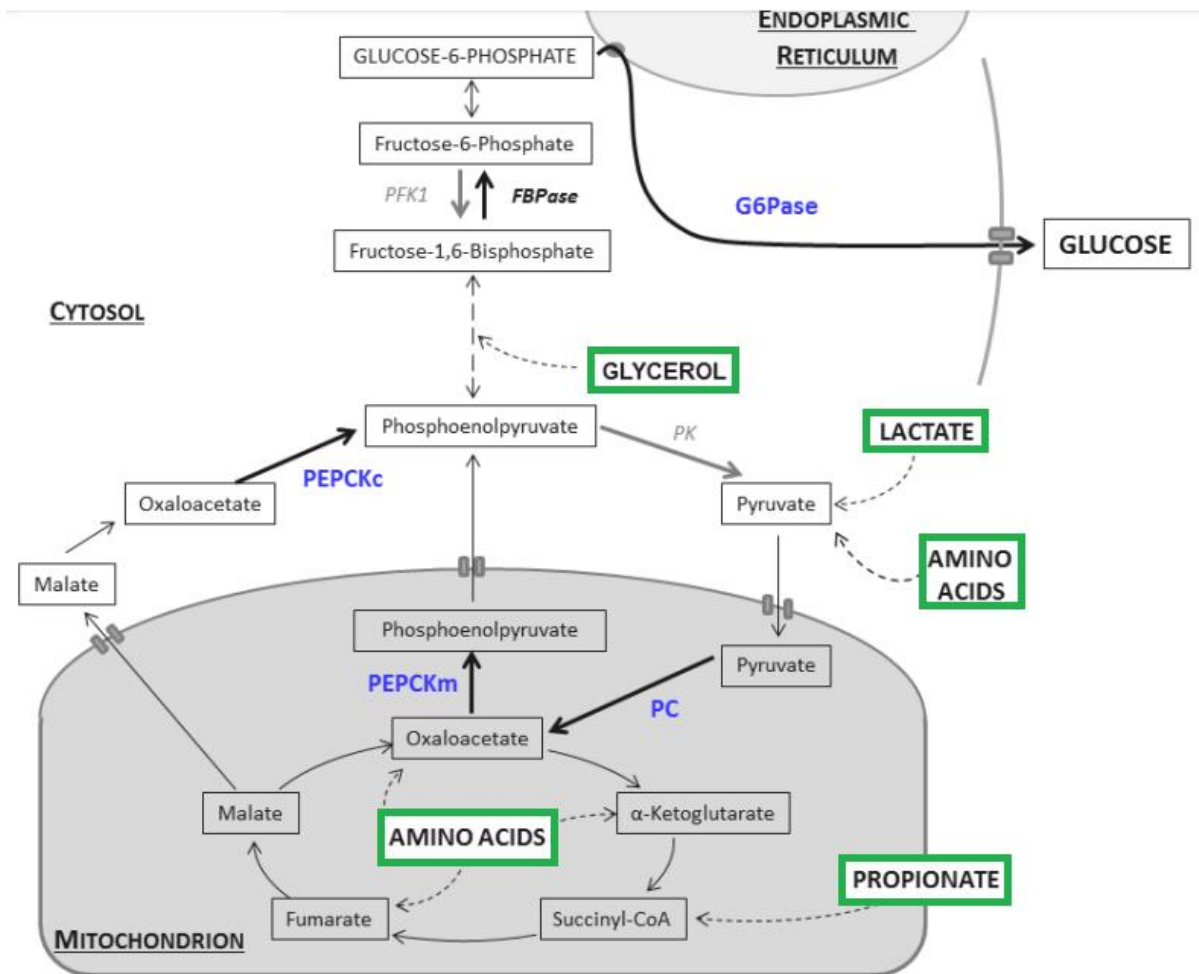


Fig. 2. Vía gluconeogénica en rumiantes. Sustratos en recuadros verdes. Enzimas clave escritas en azul. (Imagen adaptada de Hammon.)

El rumiante al disponer de un rumen absorbe mayormente tres nutrientes que son producto de la fermentación microbiana de los carbohidratos de la dieta: el propionato, el acético y el butírico, los cuales son absorbidos a nivel intestinal y viajan hacia el hígado a través del sistema porta.

Como consecuencia, la absorción intestinal de carbohidratos del alimento/dieta es muy limitada, por lo que la demanda de glucosa debe ser cubierta por síntesis de novo de glucosa casi en su totalidad, alrededor del 90% durante la lactación temprana proviene de síntesis endógena (13). El hígado es el principal órgano donde se da la síntesis de novo de glucosa aunque también se lleve a cabo en menor medida en los riñones. Los hepatocitos se encargan de la producción de la glucosa a partir de los distintos precursores que llegan a

través de la sangre, fundamentalmente propionato, y en menor medida lactato (de origen ruminal y del Ciclo de Cori), glicerol (proveniente de la movilización de triglicéridos del tejido adiposo) y ciertos aminoácidos (de origen endógeno por degradación de proteína muscular, en especial alanina, glicina y serina) (14). La contribución por parte de cada precursor gluconeogénico varía según el estado metabólico y momento de lactancia, aumentando el aporte de precursores endógenos (glicerol/lactato/aminoácidos), en momentos de balance energético negativo o de alta demanda energética como el pico de lactancia (15).

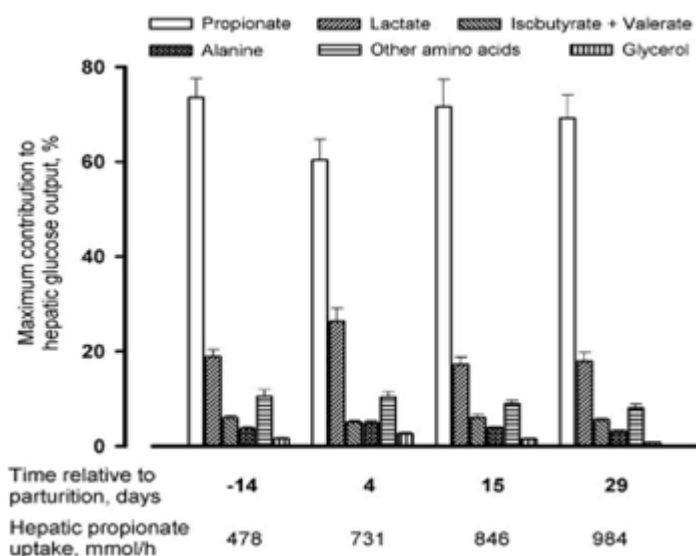


Fig 3. Contribución relativa de los precursores gluconeogénicos, en función de la fecha de parto. (Aschenbach et al., 2010.)

La producción endógena de glucosa funciona como el soporte del mérito genético para la producción de leche. Los animales de alta producción de leche a menudo tienen dificultades para satisfacer la alta demanda de glucosa dada por los requerimientos necesarios para la producción de lactosa en la glándula mamaria, especialmente en el pico producción. En términos cuantitativos, el animal pasa de un requerimiento de alrededor de los 400 g/día de glucosa para su mantenimiento (16) a 3 kg/día de glucosa a las 3 semanas postparto, con una producción de 36 kg diarios de leche (17). Este incremento en la demanda no puede ser cubierto inmediatamente por un aumento en la absorción de precursores a nivel digestivo (10,18). La adaptación a estos requerimientos altos de glucosa llevan a la vaca a movilizar reservas lipídicas, proteicas y minerales que serán utilizadas como precursores para la gluconeogénesis en el hígado, ya que los ingeridos en la dieta se hacen insuficientes. La movilización exacerbada de reservas, llevan al animal a perder peso y consecuentemente condición corporal. La movilización desmedida de lípidos puede dar lugar patologías hepáticas como el hígado graso, por acumulación de triglicéridos o a cetosis por síntesis

desmedida de cuerpos cetónicos. La movilización de aminoácidos proviene de tejido muscular, se ha reportado pérdida de hasta 25% del diámetro de la fibra muscular en los días inmediatos al parto (9). Por otro lado, el origen del lactato, puede ser tanto endógeno proveniente del ciclo de cori, o provenir desde el rumen por fermentación de carbohidratos por parte de la microbiota. El aporte de lactato ruminal aumenta cuando las dietas son ricas en almidón, sin embargo se ha visto que la flor ruminal produce el isómero D-lactato, el cual es metabolizado a tasas más lentas en el hígado en comparación al isómero L-Lactato.

Otra de las estrategias es la priorización del uso de la glucosa en la glándula mamaria, este mecanismo involucra cambios endocrinos, principalmente por una baja de los niveles de insulina en plasma, lo que termina por disminuir la captación de glucosa por tejidos sensibles a la insulina como músculos y tejido adiposo, permitiendo a la glándula mamaria, no sensible a la insulina, obtener mayor cantidad de glucosa disponible (10).

En resumen, la capacidad de utilizar sustratos endógenos es lograda por cambios a nivel molecular en los hepatocitos, en respuesta a señales extra hepáticas que incluyen regulaciones hormonales, y cambios en la concentración de ciertos metabolitos en sangre. Se ha demostrado una fuerte relación entre la expresión de ciertos genes y el estado fisiológico y nutricional del animal. (19,20)

1.3 Vía de señalización de la AMPK

La proteína quinasa activada por AMP (AMPK, por sus siglas en inglés) es un complejo proteico heterotrimérico altamente conservado en eucariotas. Se trata de una serina/treonina quinasa, que funciona como un regulador de diversas vías metabólicas en una serie de tejidos. Particularmente en el hígado su función modula el metabolismo lipídico y de la glucosa, en respuesta factores ambientales y nutricionales. Esta modulación se da por fosforilaciones de distintos blancos, que incluyen enzimas y factores de transcripción.

Su activación se da luego de ser fosforilada en la treonina (Thr172) de la subunidad catalítica alfa. Esta fosforilación puede ser catalizada por dos quinasas *upstream*, LKB1 y CaMKK2. La activación de estas dos quinasas se da por mecanismos distintos, pero que convergen finalmente en la activación de AMPK.

La activación por CaMKK2, una calmodulina, se da por incrementos del Ca²⁺ intracelular, este aumento se puede dar por distintos motivos, uno de estos es por la acción indirecta de hormonas en especial la leptina y la adiponectina. La unión de la hormona a su receptor, desata una cascada, que tiene como consecuencia la liberación hacia afuera de la célula de inositol trifosfato, con una liberación simultánea de calcio intracelular. Este aumento de calcio intracelular provoca la activación de la CaMKK2 y la posterior fosforilación de distintas proteínas blanco, entre ellas la AMPK. (21,22)

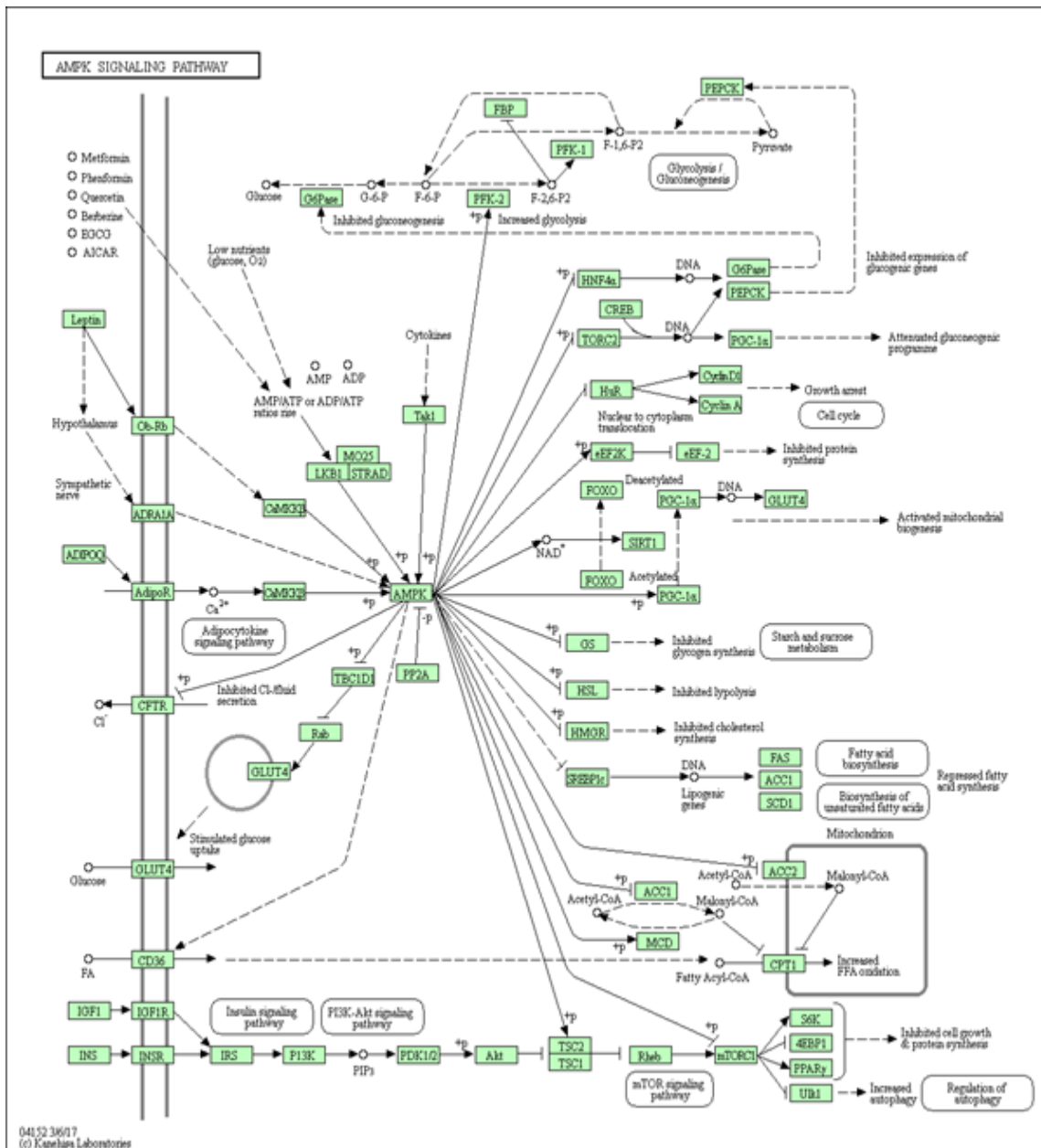


Fig 5. Vía de señalización de AMPK. (KEGG)

2.Objetivos

2.1 Objetivo general:

Estudiar la expresión y regulación de la vía gluconeogénica en vacas lecheras Holstein Friesian de alta producción sometidas a dos estrategias de alimentación contrastantes durante la curva de lactancia.

2.2 Objetivos específicos:

En biopsias hepáticas de vacas lecheras sometidas a dos estrategias de alimentación contrastantes:

- Determinar los niveles de glucosa libre y glucógeno a lo largo de la curva de lactancia.
- Estudiar la activación de la vía de señalización de AMPK durante dos fechas representativas de lactancia temprana y lactancia tardía.
- Profundizar en los mecanismos de activación de la AMPK y la posible implicancia de la misma mediante el estudio de la expresión génica de enzimas claves de la gluconeogénesis.

2.3 Hipótesis

Vacas lecheras Holstein Friesian de alta producción alimentadas con dietas contrastantes tendrán diferencias en la abundancia de enzimas gluconeogénicas debido al aporte diferencial de nutrientes, en especial a enzimas que hacen a la entrada de los precursores de la vía. A su vez, estas enzimas se expresarán más durante lactancia temprana que lactancia media y tardía.

3. Metodología

3.1 Declaración ética

El uso de los animales, así como los procedimientos, fueron aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) de la Universidad de La República, Montevideo, Uruguay. (Número de carpeta: 021130-001914-15).

3.2 Diseño experimental, manejo de animales y estrategias de alimentación.

Esta fase del experimento se desarrolló en la Estación Experimental Mario Alberto Cassinoni, de la Facultad de Agronomía, en Paysandú, Uruguay.

Veinticuatro vacas Holstein-Friesian fueron agrupadas según peso vivo 664 ± 65 kg, condición corporal 3.0 ± 0.4 unidades de condición corporal y fecha de parto 18/08/2015 \pm 11 días. Las mismas fueron asignadas utilizando un diseño de bloques al azar a dos estrategias de alimentación desde el día del parto a 180 DPP. Uno de los grupos fue alimentado 100% TMR *ad libitum* (grupo control; TMR, n=12), mientras que el otro grupo fue alimentado a base de pastura y suplemento (Pas, n=12).

A las vacas del grupo control (TMR) se les ofreció TMR una vez al día luego del ordeño de la mañana durante los primeros 180 DPP. La proporción del TMR fue de 70:30 forraje y concentrado respectivamente, consistiendo los mismos de ensilaje de maíz y moha (*Setaria italica*) o heno de alfalfa, mientras que el concentrado consistió en grano de sorgo (22,6%), grano de maíz (6,8%), grano de cebada (6,8%) expeller de girasol (7,5%), expeller de soja (13,6%) además de minerales y vitaminas (1,7%). Los animales de este grupo fueron alojados en corrales libres, con cama de lana > 10 cm. En cada corral de madera (8 x 22.6 m) se ubicaron 4 vacas, donde contaban con acceso a sombra, agua y comedero.

Por otro lado, las vacas del grupo de pastoreo (Pas) pastorearon desde el día 0 al 113 DPP sobre pastura de *Festuca arundinacea* (2500 ± 490 kg de materia seca por hectárea, con 18 horas de acceso a la misma 08:00 a 16:00, y de 18:00 a 04:00 horas) en un sistema de rotación de 7 días, con una asignación promedio de 30 kg de materia seca (MS) por vaca por día. La composición química de la pastura en relación a la MS fue la siguiente, 26,4% MS, 14,2% de proteína cruda (PC), 54,7% fibra detergente neutro (FDN), 30,1% fibra detergente ácida (FDA) y 1,58 Mcal de energía neta de lactación (ENL) por kilo de materia seca. Adicionalmente, luego del ordeño de la mañana, se les ofreció 5,4 Kg de MS de un concentrado compuesto por grano de maíz (%32), grano de cebada (%31) y expeller de soja

(32%), el porcentaje de MS fue de 87%; siendo la composición química la siguiente: 16.8% PC, 28.5% FDN, 9.3% FDA y 1,83 Mcal de ENL por kg de MS. Del día 113 al 180 DPP, las vacas pastaron sobre *Medicago sativa* (1380 ± 328 kg MS por hectárea) con 10 horas de acceso a la misma (18:00 a 04:00 horas) en un sistema de rotación de 7 días, con una asignación promedio de 20 kg de MS por vaca por día. La composición química de la pastura en relación a la MS fue la siguiente, 26,4% MS, 23,3% PC, 30,1% FDN, 24,7% FDA y 1,68 Mcal de ENL por kg de MS. Durante este periodo, luego del ordeño de la mañana, las vacas recibieron, 50% de TMR del ofrecido a las vacas del grupo TMR, compuesto de silo de maíz (23,3%), heno de alfalfa (19%), grano de sorgo (20,8%), grano de maíz (11,8%), grano de cebada (11,5%), expeller de soja (11,8%), y minerales y vitaminas (1,8%). Siendo la composición química la siguiente: 41,5% MS 11,1% PC, 32,1% FDN, 22,0% FDA y 1,64 Mcal de ENL por kg de MS.

A partir del 180 DPP y hasta el final de la lactancia, tanto las vacas del grupo TMR como las del grupo Pas se sometieron a la misma dieta, en la que pastaron sobre *Festuca arundinacea* (2340 ± 291 kg de MS por hectárea, en un sistema rotacional de 7 días, y acceso a pastura de 11.5 horas en horario de 16:30 a 04:00, con una asignación promedio de 20 kg de MS por vaca por día). La composición química de la pastura en relación a la MS fue la siguiente 28.3% MS, 10.1% PC, 56.6% FDN, 32.2% FDA y 1,48 Mcal de ENL por kg de MS. Los animales fueron suplementadas luego del ordeño de la mañana con el 50% de lo ofrecido a las vacas TMR a los 180 DPP; 23.4% silo de maíz, 12.4% heno de alfalfa, 28.3% grano de sorgo, 11.5% grano de maíz, 11.1% grano de cebada, 11.5% expeller de soja, y 1.8% minerales y vitaminas. Siendo la composición química: 50% MS, 12.5% PC, 29.7% FDN, 18.8% FDA y 1,76 Mcal de ENL por kg de MS.

La proporción de pastura y TMR de la dieta fue calculado para cada tratamiento, en las vacas alimentadas con TMR se estimó en base a la diferencia entre el alimento ofrecido y el rechazado, mientras que para las vacas de pastura se calculó en base a requerimientos del NRC (National Research Council). En las vacas del grupo TMR, y desde el día 0 DPP a 180 DPP las vacas se alimentaron 100% a base de TMR, mientras que en las vacas del grupo Pas fue de 73.4% pastura, 26.6% de concentrado en los días 0 a 113 DPP, y de 32.7% pastura 67.3% TMR en los días 114 a 180 DPP; de los 180 a los 250 DPP la dieta consistió de 28% pastura y 72% TMR para las vacas tanto del grupo TMR como del grupo Pas.

Tabla 1. Estimación de nutrientes de ambas estrategias de alimentación.

	TMR	PAS		Ambos grupos
DPP	0 - 180	0 - 113	114 - 180	>180
Composición química				
Materia seca (%)	43,1	42,4	36,5	43,9
Proteína cruda (%MS)	12,9	14,9	15,1	11,8
FDN (%MS)	33,8	47,6	31,4	37,2
FDA (%MS)	21,3	24,5	22,9	22,6
ENL (Mcal/kg.Ms)	1,68	1,64	1,65	1,68
Proteína metabolizable (g/d)	1854	1762	1914	1749

3.3 Obtención de la muestra de tejido.

Se realizaron biopsias de hígado usando un biopsiador con aguja calibre 14 (Tru-Core-II Automatic Biopsy Instrument; Angiotech), previa administración intramuscular de 3 mL de 2% lidocaína HCl (anestésico). (25) Las biopsias fueron realizadas en los días -14, 35, 60, 110, 180 y 250 días postparto (DPP). Para los estudios de cuantificación de glucógeno y glucosa se trabajó con las muestras de las 6 fechas, mientras que para los estudios moleculares se seleccionaron las biopsias 35,110,250 DPP, por ser consideradas representativas de los distintos estadios dentro de la curva de lactancia (lactancia temprana, media y tardía respectivamente). A su vez, también se eligió desconsiderar la fecha de parto ya que las estrategias alimenticias no estaban asignadas en ese momento (se asignan a la parición) y además debido al estrés térmico hubo un cambio de dieta imprevisto entre las fechas 110 y 180 posparto para el grupo de pastoreo por esta razón también se eligió desconsiderar la fecha +180 para estudios moleculares.

3.4 Cuantificación de contenido de glucosa y glucógeno hepático.

3.4.1 Homogenizado de hígado para cuantificación de glucosa y glucógeno.

Se pesaron entre 15-25 mg de tejido hepático, que luego fueron transferidos a 0.5 mL de HCl 2.0 M. La disgregación del tejido fue llevada a cabo utilizando homogeneizador dounce de vidrio. Una vez conseguida la disgregación completa del tejido se transfirió el volumen a tubos eppendorf, los cuales se congelaron a -80°C hasta su uso.

3.4.2 Cuantificación de glucosa hepática libre.

Se tomaron 50 μL del homogenizado ácido y se neutralizó con igual volumen de NaOH 2.0 M. Se vortexearon las muestras. Todos los procedimientos se realizaron en hielo. Posteriormente se tomaron 2 μL de cada muestra y se sembraron por duplicado en placa de 96 pocillos. Se construyó una curva a partir del patrón proporcionado por el fabricante con el fin de validar el ensayo. La concentración se determinó por el sistema glucosa oxidasa/peroxidasa utilizando el reactivo de BioSystems. Una vez agregado el reactivo se incubó la placa a temperatura ambiente durante 10 minutos y se leyó en lector de placas a longitud de onda 520 nm.

3.4.3 Cuantificación de glucógeno hepático.

Se tomaron 50 μL del homogenizado ácido, el mismo fue neutralizado con igual volumen de NaOH 2.0 M. Se vortexearon las muestras. Las muestras fueron incubadas en termobloque durante dos horas a 102°C. Posteriormente se tomaron 2 μL de muestra y se sembraron por duplicado en placa de 96 pocillos. Se construyó una curva a partir del patrón para validar el ensayo. La concentración se determinó por el sistema glucosa oxidasa/peroxidasa utilizando el reactivo de BioSystems. Una vez agregado el reactivo se incubó la placa a temperatura ambiente durante 10 minutos y se leyó en lector de placas a longitud de onda 520 nm.

El coeficiente intraensayo para las cuantificaciones de glucosa libre y de glucógeno fue del 10,8% .

3.5 Extracción de ARN

Para realizar la extracción de ARN total, se partió de aproximadamente 50 mg de tejido hepático. El tejido se resuspendió en 900 μL de Trizol (Invitrogen) para luego homogenizar. Se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente se agregaron 200 μL de cloroformo, se vortexeó y se incubó a temperatura ambiente durante 3 minutos. Se centrifugó durante 15 minutos, 13000 g, a 4°C. Se transfirió la fase acuosa superior resultante a un nuevo eppendorf. A esta fase acuosa se le agregaron un volumen igual de triple mezcla fenol:cloroformo:isoamilalcohol (25:24:1) . Se procedió a otra incubación durante 15 minutos a temperatura ambiente, para posteriormente centrifugar por 15 minutos a 4°C 13000 g. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo eppendorf, y se le agregaron 500 μL de isopropanol. Luego de mezclarlo, e incubarlo a temperatura ambiente durante 10 minutos, se centrifugó bajo las condiciones ya mencionadas, para luego descartar el sobrenadante y quedarse con el pellet. Finalmente se resuspende el pellet en 1 mL de etanol 75%. Se realiza una última centrifugación durante 5 minutos a 4°C, 13000 g. Se descarta el etanol, y finalmente se disuelve el ARN en H₂O DEPC y se almacena a -80°C hasta su uso. (25)

3.6 Precipitación con Cloruro de Litio.

Para la precipitación se agregaron 30 μL de Cloruro de Litio 2.5 M y se incubó a -20°C durante 1 hora. A continuación se centrifugó durante 20 minutos a 4°C y 13000 g. Se decantó el sobrenadante y se lavó con 400 μL de etanol 75% procurando romper el pellet. Posteriormente se procede a realizar otra centrifugación durante 5 minutos, 4°C, y 13000 g. Se decantó el sobrenadante y se secó el pellet. El control de integridad, presencia de contaminantes y determinación de la concentración se realizó midiendo en nanodrop (NanoDrop 2000, Thermo Scientific), el coeficiente de absorbancia 260/280 y 260/230.

3.7 Tratamiento con DNasa.

Con el fin de eliminar posibles restos de ADN genómico, se realizó un tratamiento con DNA-free kit de Ambion, Life technologies. Se pipetearon 10 µg del ARN total obtenido luego de la precipitación con cloruro de litio, se adicionaron 3 µL de DNase buffer y 1 µL de DNase 2U/µL, para luego llevar a 30 µL de volumen final con H₂O DEPC. Se incubó a 37°C durante 10 minutos, y posteriormente se detuvo la acción de la DNase con el DNase inactivation reagent dejándolo actuar por 2 minutos. Posteriormente se centrifugó 1 minuto, 13000 g, guardando el sobrenadante y descartando el pellet del reactivo de inactivación.

Se determinó concentración, coeficientes de absorbancia 260/280 y 260/230, en nanodrop (NanoDrop 2000, Thermo Scientific).

3.8 Retrotranscripción.

El pasaje del ARN total a ADN copia, fue realizada utilizando la enzima SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Inicialmente se partió de una mezcla de dNTPs, ARN (1 µg) y random primers, esta mezcla se incubó durante 5 minutos a 65°C, e inmediatamente durante 1 minuto en hielo.

Luego se agregaron el First-Strand Buffer (Tris HCl, NaCl, EDTA, Glicerol), DTT, y la enzima retrotranscriptasa SuperScript III RT (Thermo Fisher Scientific). El volumen final de reacción fue de 20 µL. En termociclador se llevó las muestras a 25°C durante 5 minutos, 60 minutos a 50°C, y finalmente una inactivación a 70°C por 15 minutos. El ADNc fue almacenado a -20 °C hasta su uso.

3.9 PCR en tiempo real.

Se diseñaron los primers correspondientes para amplificar los genes, *ADIPOR1*, *G6PC*, *PCPCK1*, *PPAR-G*, *ADIPOR1* y *Ob-Rb*.

La RT-PCR fue realizada en el equipo StepOne (Applied BioSystems), utilizando el reactivo Maxima SYBR Green/Rox qPCR Master Mix (Thermo scientific). Según recomendación del fabricante, se sembraron 50 ng de ADNc, junto a 0,4 µL 10 mM de primer, 7,5 µL de SYBR Green Master mix, y se completó con agua nucleasa free hasta llegar a volumen final de reacción de 15 µL. El programa de ciclos fue el siguiente:

Tabla 2.. Programa de ciclos para qPCR.

Etapa	Temp (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	10 min	1
Desnaturalización	95	15 s	40
Annealing/extensión	60	60 s	

Luego de una revisión bibliográfica se seleccionaron como genes housekeeping para la normalización, beta actina (ACTB) y hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa (HPRT). Se verificó que estos no se vean afectados por los DPP ni por los tratamientos. Se alcanzó la normalidad (test de shapiro wilk) en los datos, por transformaciones logarítmicas y a través de la remoción de outliers con el criterio explicitado en la sección de análisis estadístico.

Adicionalmente se realizó el análisis de curva de melting para confirmar un único pico correspondiente a la amplificación de un único target.

Se estudiaron los coeficientes de variación, inter e intraensayo de las qPCR para cada gen, esto se realizó mediante la comparación del CT del control interno (calibrador). El promedio del coeficiente de variación intraensayo fue del 6%.

3.10 Western Blot

3.10.1 Preparación de homogeneizados para Western Blot

Los homogeneizados se realizaron a partir de entre 10-20 mg de tejido hepático. Éste se homogeneizó en 10 volúmenes de buffer STM previamente enfriado (Sacarosa 250 mM, Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM), ajustado a pH 7,4 , al cual se le agregaron inhibidores de proteasas (SigmaFast Protease Inhibitor Cocktail fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM), inhibidores de desacetilasas (tricostatina 1 µM y nicotinamida 5 mM), e inhibidores de fosfatasa (Pierce Protease and Phosphatase Inhibitor

Mini Tablets). (26) La cuantificación proteica de los homogeneizados se realizó por Bradford, utilizando curva estándar de BSA.

3.10.2 Electroforesis

Se realizó una SDS-PAGE para resolver los homogeneizados, condiciones Tris-Glicina, gel de poliacrilamida 12%, durante 2 horas a 65 V, 135 mA. Se diluyeron los homogeneizados para obtener 1 µg en buffer Laemmli con 2% β-mercaptoetanol y se los incubó durante 5 minutos a 95°C para lograr la desnaturalización. Junto a las muestras se sembró el marcador de peso SDS7B2 (Sigma Aldrich).

3.10.3 Transferencia

Una vez resueltas las proteínas en el gel de poliacrilamida, se procedió a realizar la transferencia hacia membrana de nitrocelulosa overnight a 65 mA. Se realizó una tinción con colorante de Ponceau (0.1% Colorante de ponceau, 1% ácido acético, 99% H₂O) para confirmar el pasaje de las proteínas hacia la membrana. Las membranas se lavaron con TBS-Tween, para luego proceder a realizar el bloqueo de la misma utilizando 5% de leche descremada en buffer TBS-Tween.

3.10.4 Detección de las proteínas

Los anticuerpos primarios utilizados fueron AMPKα Antibody 2532, y Phospho-AMPKα (Thr172) (40H9) Rabbit mAb ambos de Cell Signaling Technologies, y a concentración 1:1000. En el caso del control de carga se utilizó Mouse mAb β-actina (sc-81178, Santa Cruz) a una concentración 1:1000. Luego de la incubación con los anticuerpos primarios, se lavaron las membranas y se incubó el anticuerpo secundario anti-conejo IRDye 800, 926–32211 (LI-COR Biosciences) a una concentración 1:20000. La detección se realizó utilizando fluorescencia infrarroja (Odyssey, LI-COR Biosciences), el análisis cuantitativo fue realizado por densitometría utilizando el software ImageStudio (LI-COR Biosciences).

3.11 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados en bloques al azar utilizando el software SAS System Program (SAS Academic Edition; SAS Institute Inc, Cary, NC, USA). Se utilizaron los procedimientos Reg y Univariate para detectar outliers e inconsistencias y para verificar la normalidad de los valores residuales. En el caso de los resultados de expresión génica la normalidad se alcanzó a través de la transformación logarítmica y quitando outliers. El criterio para la remoción de outliers, fue que su valor residual de student, entre -4 y 4. Se analizaron los datos como medidas repetidas en el tiempo utilizando el procedimiento MIXED, el modelo incluyó el tratamiento, el momento de lactancia (es decir DPP), y su

interacción como efecto fijo, bloque y vaca como efecto al azar, fecha de parto, peso y condición corporal, como covariables cuando $p < 0.20$. Diferencias entre grupos fueron analizadas por test de Tukey-Kramer. Los análisis de correlación entre variables fueron realizados por el procedimiento CORR. Las gráficas fueron realizadas con el software GraphPad Prisma.

4.Resultados Obtenidos.

4.1 Composición hepática de glucosa y glucógeno durante la curva de lactancia.

A pesar de no evidenciar interacción, las reservas de glucógeno en el hígado fueron afectadas tanto por la fecha relativa al parto ($P < 0.0001$), como por el tratamiento ($P < 0.01$). Se observa una fuerte caída desde el parto hacia la lactación temprana, volviendo a recuperar en los inicios de la lactación temprana, y volviendo a caer durante la lactación temprana y tardía. Consideramos que la primera caída podría estar atribuida a la movilización de reservas que ocurre durante lactancia temprana en pro de la producción de leche.

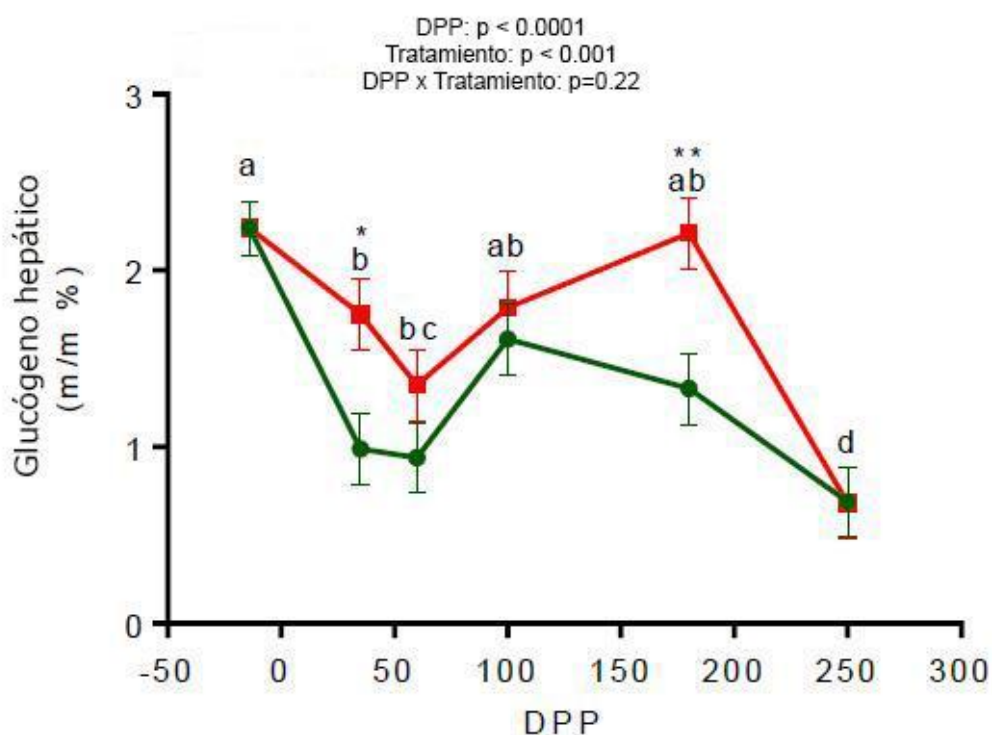


Fig. 6 Porcentaje de glucógeno en tejido hepático a los -14,35,60,110,180,250 DPP, TMR (Dieta totalmente mezclada,rojo) ,PAS (Pastura, verde). Letras distintas representan diferencias entre fechas ($P < 0.05$), * representa diferencias entre tratamientos ($P < 0.05$) según test de Tukey.

Por otro lado, especulamos que la bajada observada en lactancia tardía podría deberse a la movilización reflejo del cese de consumo por el estrés térmico (Diciembre, 2015). Con respecto a las estrategias de alimentación, se encontró que las vacas con dieta TMR presentaron mayor concentración de glucógeno, según test de Tukey esto se debió a diferencias significativas en las fechas +35 DPP (1.75 ± 0.2 m/m % vs. 0.99 ± 0.2 m/m % TMR vs Pas), y en la fecha +180 DPP (2.2 ± 0.2 m/m % vs. 1.33 ± 0.2 m/m % TMR vs Pas).

En el caso de la cuantificación de glucosa libre el único efecto significativo es el de la fecha ($P < 0.001$), demostrando que aumenta desde el parto hacia la lactación temprana y luego baja recuperando los niveles del parto en la lactancia tardía. Este aumento en glucosa libre hepática puede estar asociado a una mayor movilización del glucógeno. En la fecha +35 DPP, glucosa libre y glucógeno se comportan opuestamente, esto se verifica por una correlación negativa entre estas variables, en esa fecha ($r = -0.42$, $P < 0.05$). A nivel fisiológico, esto se puede explicar por un aumento en la glucosa libre a expensas del uso de reservas como el glucógeno, para lograr satisfacer la demanda de glucosa para la producción de leche.

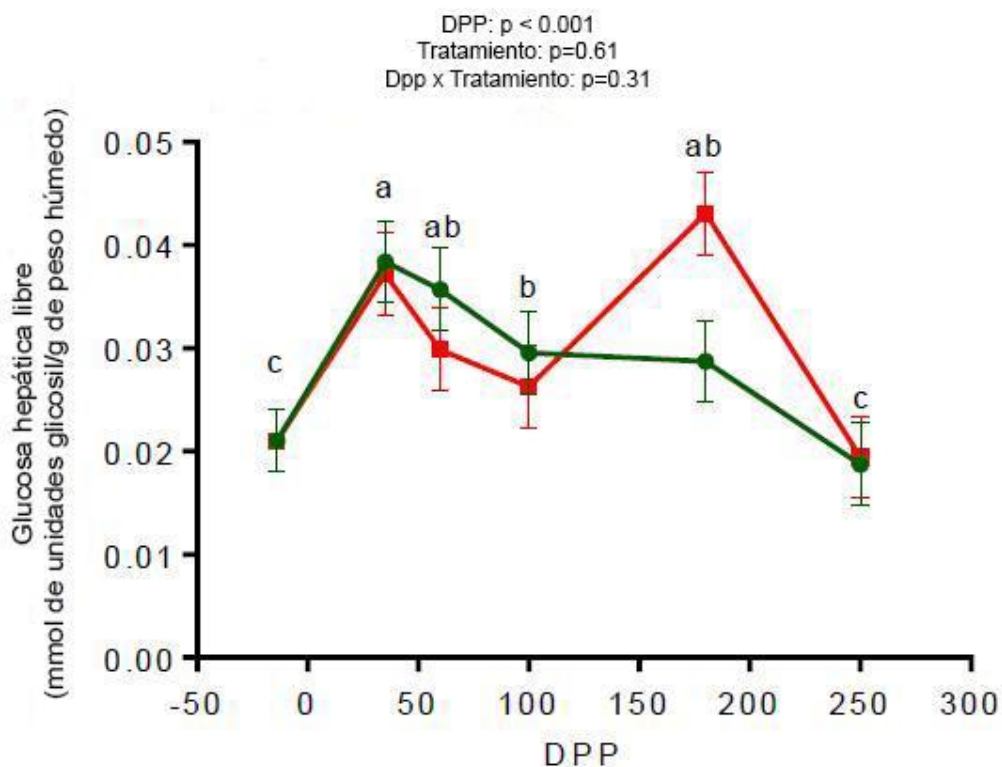


Fig. 7 Glucosa libre en hígado a los -14,35,60,110,180,250 DPP (días post parto), TMR (dieta totalmente mezclada ,rojo),PAS (pastura,verde). Letras distintas representan diferencias entre fechas (P < 0.05).

Como se evidencia en las gráficas, las fechas seleccionadas para hacer los estudios de expresión génica de la vía gluconeogénica (+35, +110, +250 DPP) resultan ser las más contrastantes. Es en estas fechas cuando, se movilizan reservas a principio de la lactancia (+35), las cuales comienzan a recomponerse durante lactancia media (+110) pero vuelven a caer durante lactancia tardía (+250).

4.2 Estudio de la vía de señalización de AMPK.

Para profundizar en los mecanismos moleculares que explicaran las diferencias observadas en niveles de glucosa y glucógeno hepático, estudiamos la activación, es decir la fosforilación, en la Thr172 de la proteína AMPK, durante el periodo de transición. Para ello se estudió la expresión proteica de la AMPK y la fosforilación de la misma mediante la técnica de western blot.

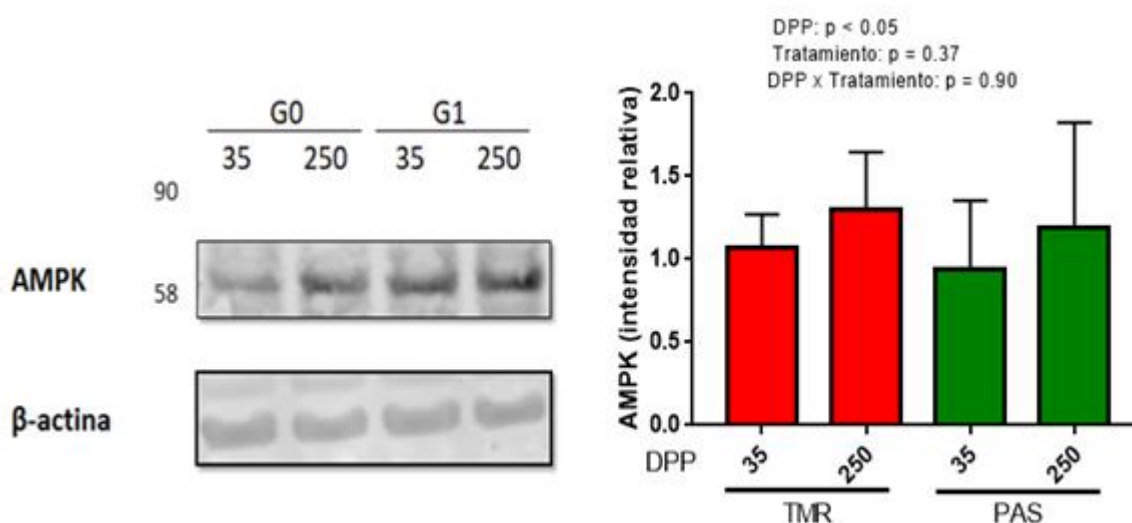


Fig.8 Niveles de AMPK total. (A). Membrana de western blot representativa de AMPK en homogeneizados de tejido hepático en ambos grupos, TMR y Pas, durante las fechas 35 DPP y 250 DPP y el correspondiente control de carga. (B). Cuantificación relativa de los niveles de AMPK en hígado (N=8). TMR: Vacas alimentadas con TMR *ad libitum* desde la parición a 180 DPP. PAS: Vacas alimentadas en pastura de *Festuca arundinacea* y suplementadas con concentrado comercial, o en pastura de *Medicago sativa* suplementadas con TMR (50% de lo ofrecido a TMR), dependiendo de las condiciones y el estrés térmico, desde la parición a los 180 DPP. Desde 180 a 250 DPP ambos grupos se alimentaron con pastura de *Medicago sativa* y fueron suplementadas con TMR (50% de lo ofrecido a TMR a los 180 DPP).

En la figura 8 se observa una membrana representativa de AMPK total (A) y como se puede ver en el gráfico de barras (B), hubo un efecto únicamente entre fechas ($p < 0.05$), en la fecha 250 DPP se observa una mayor expresión proteica de AMPK (25% aproximadamente). No se encontraron diferencias en relación a las dietas.

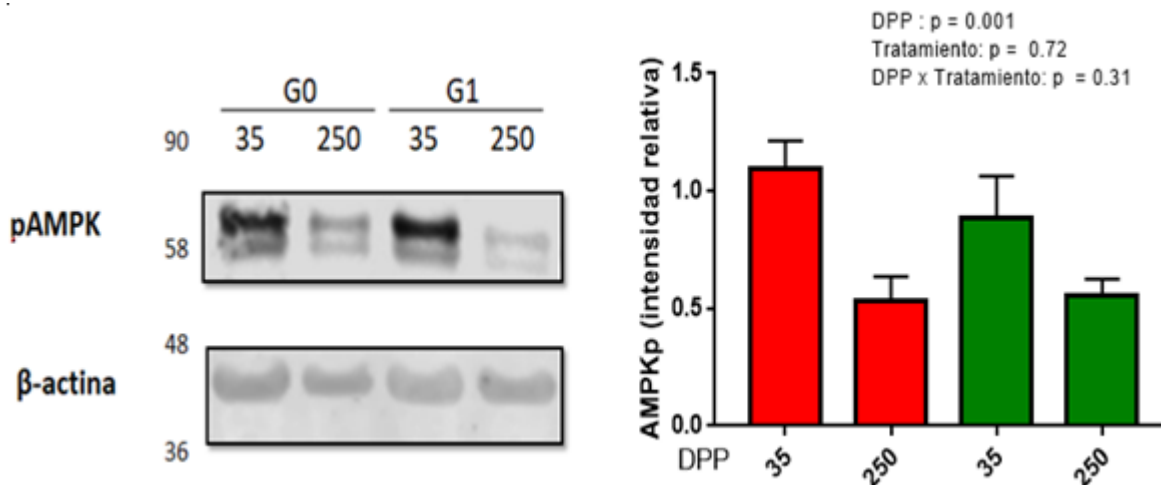


Fig.9 Niveles de AMPK fosforilada. (A). Membrana de western blot representativa de AMPK fosforilada (pAMPK) en homogeneizados de tejido hepático en ambos grupos, TMR y Pas, durante las fechas 35 DPP y 250 DPP y el correspondiente control de carga. (B). Cuantificación relativa de los niveles de AMPK en hígado (N=8). TMR: Vacas alimentadas con TMR *ad libitum* desde la parición a 180 DPP. PAS: Vacas alimentadas en pastura de *Festuca arundinacea* y suplementadas con concentrado comercial, o en pastura de *Medicago sativa* suplementadas con TMR (50% de lo ofrecido a TMR), dependiendo de las condiciones y el estrés térmico, desde la parición a los 180 DPP. Desde 180 a 250 DPP ambos grupos se alimentaron con pastura de *Medicago sativa* y fueron suplementadas con TMR (50% de lo ofrecido a TMR a los 180 DPP).

En relación a la AMPKp también se observó un efecto únicamente de la fecha ($p=0.001$). En este caso, y contrario a lo que se observó con AMPK total, se vió una mayor intensidad relativa para las bandas de la fecha 35 DPP con respecto a 250 DPP. En DPP 35, para la dieta de pastura AMPKp se encontraba 35% más fosforilada en relación a 250 DPP. Mientras que para el grupo de TMR, este porcentaje aumentó al 52% aproximadamente. No se observó diferencia significativa entre los tratamientos.

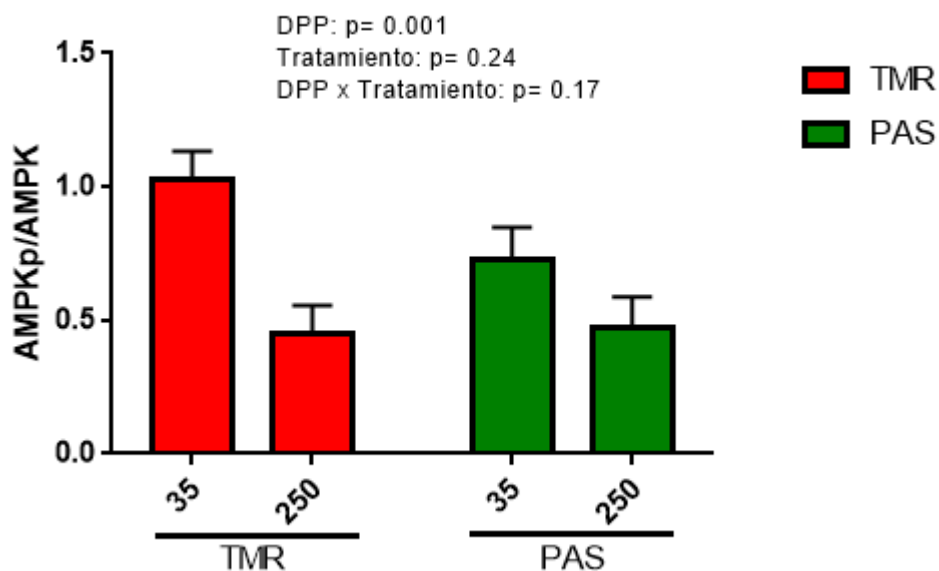


Fig.10 Coeficiente de fosforilación de AMPK. Coeficiente (AMPKp/AMPK total) para ambos grupos, en las fechas 35 y 250 DPP. El gráfico de barras presenta la media del coeficiente \pm error estándar. TMR: Vacas alimentadas con TMR *ad libitum* desde la parición a 180 DPP. PAS: Vacas alimentadas en pastura de *Festuca arundinacea* y suplementadas con concentrado comercial, o en pastura de *Medicago sativa* suplementadas con TMR (50% de lo ofrecido a TMR), dependiendo de las condiciones y el estrés térmico, desde la parición a los 180 DPP. Desde 180 a 250 DPP ambos grupos se alimentaron con pastura de *Medicago sativa* y fueron suplementadas con TMR (50% de lo ofrecido a TMR a los 180 DPP).

A partir del coeficiente AMPKp/AMPKtotal se pueden sacar conclusiones sobre lo que sucede con esta vía en las fechas estudiadas. Los datos obtenidos nos permiten afirmar que existe un efecto significativo de la fecha ($p=0.001$) sobre la fosforilación de AMPK, y que la misma se encuentra fosforilada en mayor proporción durante la lactancia temprana.

Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió estudiar la vía en mayor detalle, particularmente enfocado en un posible impacto en la vía gluconeogénica. Para esto se trabajó a nivel de expresión génica de activadores de la vía ubicados a nivel *upstream* o cascada arriba, como *downstream* o cascada abajo, en particular de estos últimos se hizo foco sobre los relacionados con los genes de enzimas, así como de un factor de transcripción relacionados a la vía gluconeogénica.

Tabla 3. Expresión relativa de los genes *upstream* de la vía de señalización del AMPK.

Gen	Tratamiento	DPP			SEM	p valor		
		35	110	250		DPP	Trat	DPP x Trat
ObRb	Pastura	1,267	1,035	1,363	0,408	< 0.05	0,8	0,85
	TMR	1,403	0,816	1,059				
ADIPOR1	Pastura	2,226	1,623	1,833	1,345	0,07	0,67	0,65
	TMR	2,97	1,405	1,877				

Todos los datos se muestran como medias de mínimos cuadrados = error estándar (SEM) (N = 10). a, b Letras diferentes indican diferencias entre filas y columnas (P < 0.05) según la prueba de Tukey-Kramer. TMR: Vacas alimentadas con TMR *ad libitum* desde la parición a 180 DPP. Pas: Vacas alimentadas en pastura de *Festuca arundinacea* y suplementadas con concentrado comercial, o en pastura de *Medicago sativa* suplementadas con TMR (50% de lo ofrecido a TMR), dependiendo de las condiciones y el estrés térmico, desde la parición a los 180 DPP. Desde 180 a 250 DPP ambos grupos se alimentaron con pastura de *Medicago sativa* y fueron suplementadas con TMR (50% de lo ofrecido a TMR a los 180 DPP)

Por un lado, se estudió la expresión del gen del receptor de leptina (ObRb), los resultados obtenidos muestran un efecto de la fecha (p < 0.05).

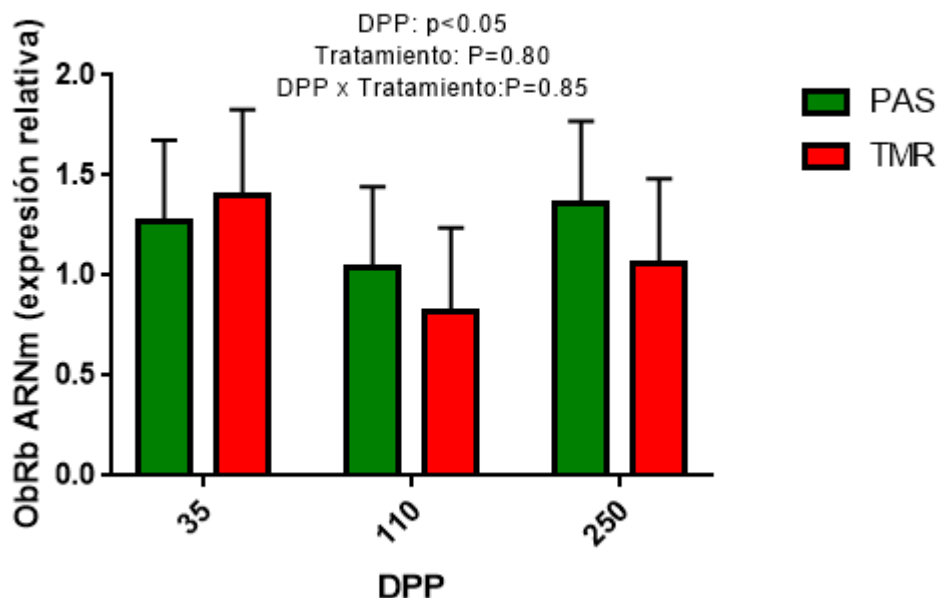


Fig.12 Expresión relativa del receptor de leptina tipo b. Expresión normalizada de ObRb, para ambos grupos TMR y PAS, durante las tres fechas 35,110,250 DPP. Gráfico de barras presenta valor de media \pm error estándar.

En relación a la vía AMPK no se observaron correlaciones que indiquen un rol activo del receptor de leptina en la activación de la vía.

Adicionalmente, utilizamos datos del grupo (García-Roche, sin publicar) para buscar asociaciones entre metabolitos medidos en sangre y nuestros resultados. No se encontró correlación entre el nivel del receptor de leptina en hígado con el nivel de leptina en sangre.

Se encontró una correlación positiva ($r=0.34$, $p=0.01$) entre el nivel de expresión del receptor de leptina y rquicki (Revised Quantitative Insulin Sensitivity Check Index) un indicador de la sensibilidad a insulina, esto muestra que la leptina puede funcionar como un potenciador de los efectos de la insulina. Sin embargo, los efectos encontrados fueron contrarios a los efectos esperados por la insulina. no se observó Esta correlación entre rquicki y el receptor de leptina para la fecha 35 DPP, lo que sugiere la pérdida de este efecto durante la lactancia temprana. Adicionalmente en la fecha 35 DPP, se encontró una correlación negativa y significativa ($r=-0.50$, $p=0.03$) con la concentración de glucógeno, y una correlación positiva y significativa ($r=0.51$, $p=0.02$) con los niveles de glucosa en sangre (dato aportado por Ceriani y colaboradores, sin publicar), asociadas a correlaciones

positivas y significativas con los niveles de expresión génica de tres enzimas claves involucradas en la gluconeogénesis PC, PEPCK, y G6PC.

Por otro lado, los datos obtenidos en relación al receptor de adiponectina tipo 1, muestran únicamente un efecto de la fecha. ($p=0.07$).

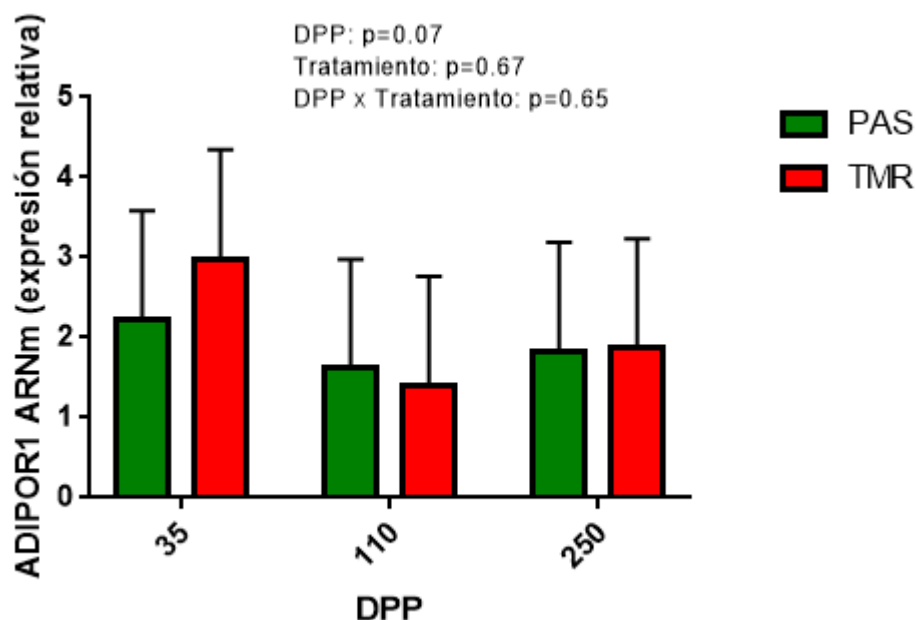


Fig.13 Expresión relativa del receptor de adiponectina tipo 1. Expresión normalizada de ADIPOR1, para ambos grupos TMR y PAS, durante las tres fechas 35,110,250 DPP. Gráfico de barras presenta valor de media \pm error estándar.

El efecto de la fecha se explica por una mayor expresión del receptor durante la lactancia temprana 35 DPP. Contrariamente a lo esperado, no se encontraron correlaciones que indiquen un rol en la activación de la vía de señalización de AMPK.

Otro resultado inesperado fue la correlación positiva y significativa encontrada entre los niveles de expresión de ARNm de ADIPOR1, con los niveles de expresión de ARNm de la enzima PEPCK.

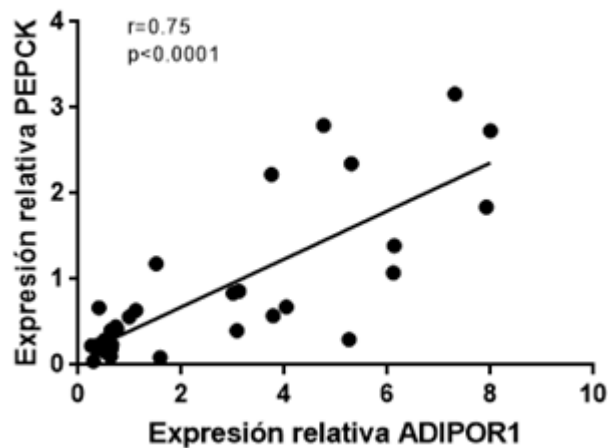


Fig. 14 Correlación de Pearson para los niveles de expresión de ADIPOR1 y PEPCK.

Estos resultados muestran la existencia de un mecanismo por el cual una mayor expresión de ADIPOR1 podría estar favoreciendo la expresión de la PEPCK enzima involucrada en la vía gluconeogénica.

4.3 Estudio de las implicancias de la activación de la vía de señalización de AMPK en la expresión de genes clave de la vía gluconeogénica.

Tabla 4. Expresión relativa de genes ubicados *downstream* a la vía de señalización del AMPK.

Gen	Tratamiento	DPP			SEM	p valor		
		35	110	250		DPP	Trat	DPP x Trat
PC	Pastura	1,738 ^a	0,856	1,434	0,427	<0.01	0,2	<0.05
	TMR	1,104 ^b	0,748	1,865				
G6PC	Pastura	0,427	0,302	0,314	0,092	0,05	0,7	0,74
	TMR	0,521	0,31	0,29				
PEPCK	Pastura	0,857	0,497	0,779	0,353	0,01	0,05	0,17
	TMR	0,835	0,181	0,385				
PPARG	Pastura	0,421	0,302	0,444	0,092	0,22	0,51	0,65
	TMR	0,332	0,328	0,406				

Todos los datos se muestran como medias de mínimos cuadrados = error estándar (SEM) (N = 10). a, b Letras diferentes indican diferencias entre filas y columnas (P <0.05) según la prueba de Tukey-Kramer. TMR: Vacas alimentadas con TMR *ad libitum* desde la parición a 180 DPP. Pas: Vacas alimentadas en pastura de *Festuca arundinacea* y suplementadas con concentrado comercial, o en pastura de *Medicago sativa* suplementadas con TMR (50% de lo ofrecido a TMR), dependiendo de las condiciones y el estrés térmico, desde la parición a los 180 DPP. Desde 180 a 250 DPP ambos grupos se alimentaron con pastura de *Medicago sativa* y fueron suplementadas con TMR (50% de lo ofrecido a TMR a los 180 DPP)

A través de la qPCR se determinó el $\Delta\Delta C_t$ con respecto a los genes de referencia. Para los genes de la vía gluconeogénica (PC/PEPCK/G6PC) se encontró un efecto de la fecha.

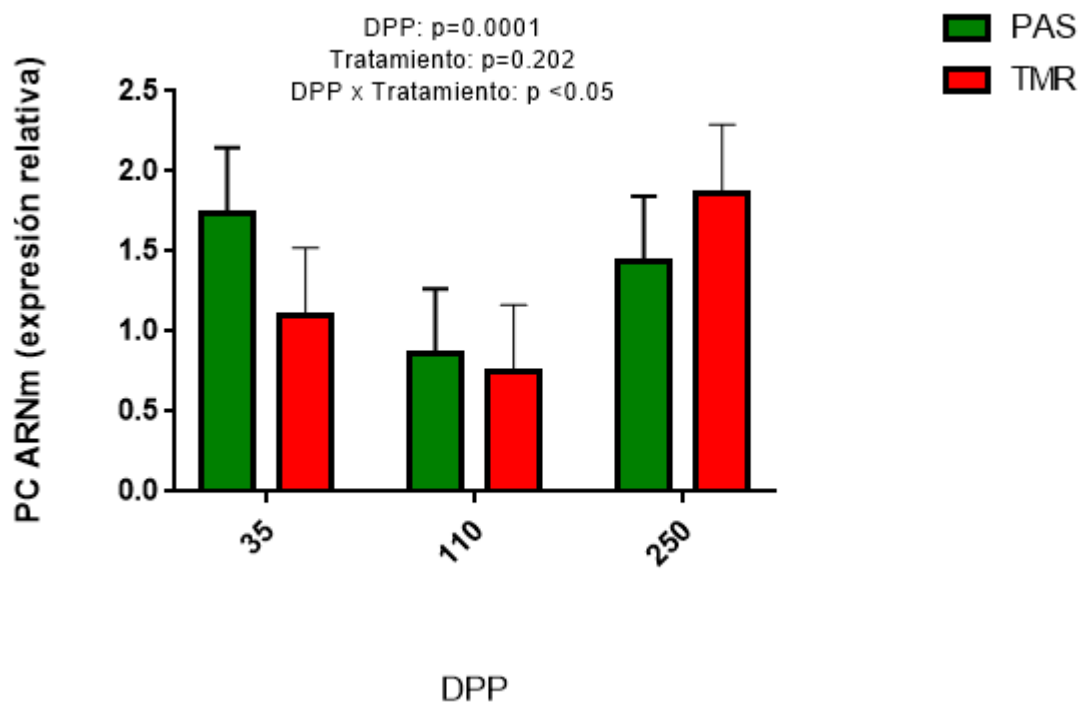


Fig.14 Expresión relativa de la piruvato carboxilasa. Expresión normalizada de PC, para ambos grupos TMR y PAS, durante las tres fechas 35,110,250 DPP. Gráfico de barras presenta valor de media \pm error estándar.

Los niveles de expresión relativa de PC, tuvieron un efecto de la fecha ($p=0.0001$). En la fecha 35 DPP existe un efecto del tratamiento encontrándose un mayor nivel de expresión para el tratamiento Pas ($p=0.07$). Para la fecha 250 DPP se ve un aumento del 105% para ambas dietas en relación a la fecha 110 DPP, y de un 16% en relación a la fecha 35 DPP.

En relación a la influencia de la vía de señalización de la vía de AMPK, se puede observar que existe una correlación negativa y significativa con el coeficiente de AMPK_p/AMPK y AMPK_p en la fecha 35 DPP. (Fig. 15). Esto sugiere una represión de la expresión de PC cuando se activa esta vía de señalización, lo que no se encuentra reportado en la bibliografía.

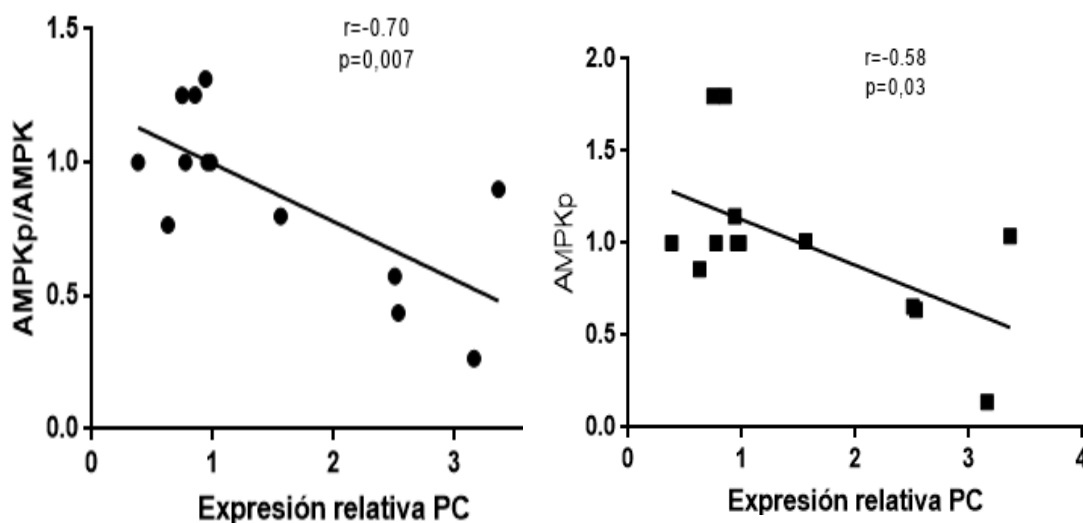


Fig 15. Correlación de Pearson para la expresión de piruvato carboxilasa y el coeficiente AMPK_p/AMPK en la fecha 35 DPP. Correlación de Pearson para la expresión de piruvato carboxilasa y AMPK_p.

Al correlacionar los niveles de expresión, con los de G6PC durante la lactancia tardía, se observó que existe una correlación positiva y significativa ($r = 0.57$, $p = 0.02$) lo que sugiere que este aumento de PC puede estar relacionado con un aumento en la producción de glucosa. Durante la lactancia tardía, se da la recomposición de reservas corporales, estos procesos anabólicos, requieren de glucosa para llevarse a cabo.

Como se observa en la figura 16, los niveles de expresión de PEPCK bajan hacia la lactancia media, para luego volver a subir durante la lactancia tardía. Esto se puede atribuir a una alta demanda de glucosa en el pico de lactancia, que luego cae hacia lactancia media, y un aumento hacia lactancia tardía asociada a una demanda no relacionada a la producción de leche sino a una demanda de glucosa dirigida a recomponer reservas tanto como energía metabólica, como para la recomposición de glucógeno en el hígado, y adicionalmente para atender la demanda del feto.

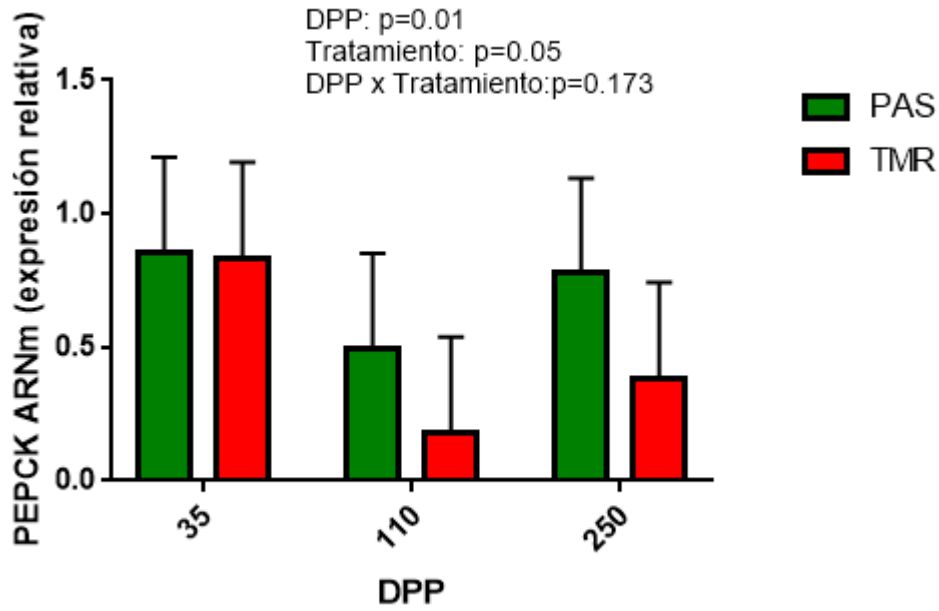


Fig.16 Expresión relativa de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa. Expresión normalizada de PEPCK, para ambos grupos TMR y PAS, durante las tres fechas 35,110,250 DPP. Gráfico de barras presenta valor de media \pm error estándar.

El efecto de la dieta ($p=0.05$) está asociada a una mayor expresión de esta enzima para las vacas del grupo Pas.

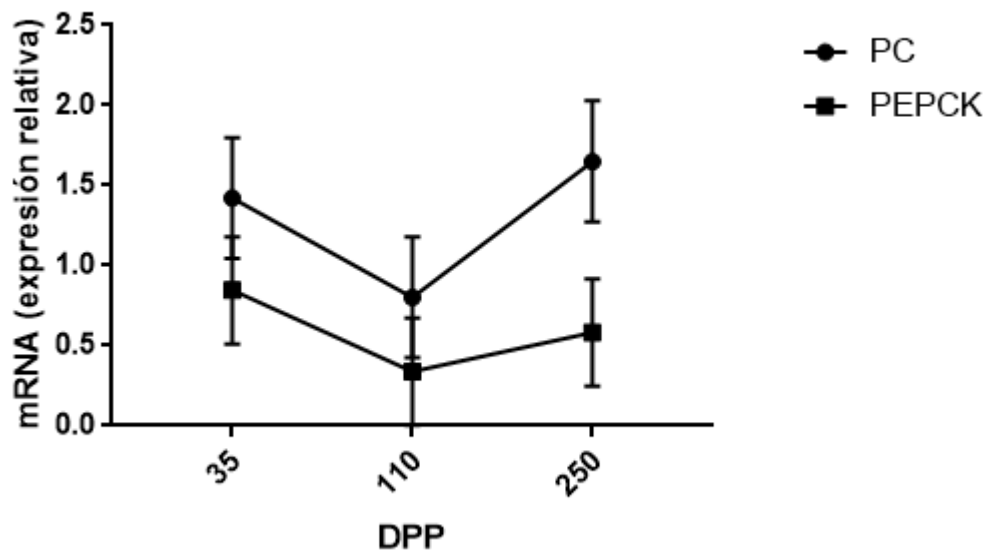


Fig. 17 Expresión relativa de la piruvato carboxilasa, y la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa.

Como se observa en la figura existe un equilibrio en la expresión de estas enzimas. La fecha donde la exigencia metabólica es más alta, y por lo tanto hay una predisposición mayor a desbalances de estas enzimas es la fecha +35 DPP. Justamente para esta fecha, se encontró una correlación positiva entre PEPCK y PC ($r=0.49, p=0.03$), esto muestra que efectivamente hay un equilibrio, y cuando PEPCK aumenta también lo hace PC. Este equilibrio permite asegurar que el pool de oxalacetato no se agote, se mantenga poder oxidativo para degradar los ácidos grasos que llegan al hígado a través de la betaoxidación. El acetil CoA generado por la degradación de los ácidos grasos debe ingresar al ciclo de krebs, para poder ser oxidado y generar ATP. El ingreso del acetil CoA al ciclo de krebs se da por la condensación una molécula de acetil CoA con una de oxaloacetato, reacción catalizada por la citrato sintasa. La disponibilidad de oxalacetato puede limitar el ingreso del acetil CoA al ciclo de krebs, cuando la disponibilidad de oxalacetato es inferior a la necesaria para canalizar el acetil CoA al ciclo de krebs, el acetil CoA es canalizado a otras rutas como la cetogénica, en la cual el acetil CoA es transformado a acetona, formando beta hidroxibutirato como subproducto, cuando esta reacción se da en exceso, se desarrolla una enfermedad metabólica conocida como cetosis.

Como se explicó la acción de PEPCK es el primer paso que direcciona hacia la gluconeogénesis. Curiosamente existe una correlación entre G6PC positiva y PEPCK ($r=0.43, p=0.001$), esto sostiene lo dicho anteriormente, es decir aumentos en la expresión de PEPCK se traducen posiblemente en mayor producción de glucosa.

No se encontró relación entre la expresión de PEPCK con la vía de señalización AMPK en ninguna de las fechas estudiadas.

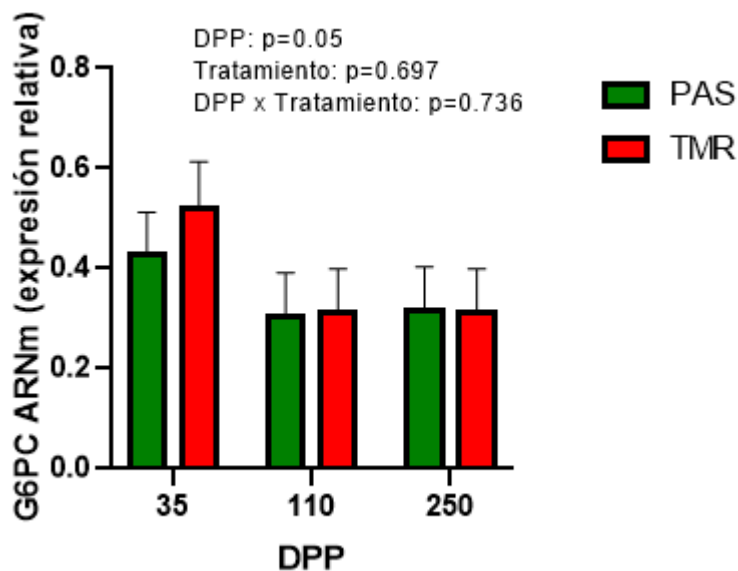


Fig.18 Expresión relativa de la Glucosa-6 fosfatasa. Expresión normalizada de G6PC, para ambos grupos TMR y PAS, durante las tres fechas 35,110,250 DPP. Gráfico de barras presenta valor de media \pm error estándar.

En el caso de la Glucosa 6 fosfatasa, tendió a haber un efecto de la fecha ($p=0.05$), como era esperable, esto viene dado por una mayor expresión de ARNm en la lactancia temprana, periodo en el que la producción de glucosa es mayor. Esta enzima es la encargada de catalizar el último paso de la gluconeogénesis, su acción fosfatasa, permite que la glucosa pueda ser exportada fuera del hepatocito.

Adicionalmente, la glucosa 6 fosfatasa también es necesaria para disponibilizar como glucosa libre, al producto de la glucogenólisis. El proceso de glucogenólisis, se da en el hígado y fuertemente durante la lactancia temprana.

No hubo efecto de las dietas en la expresión de este gen.

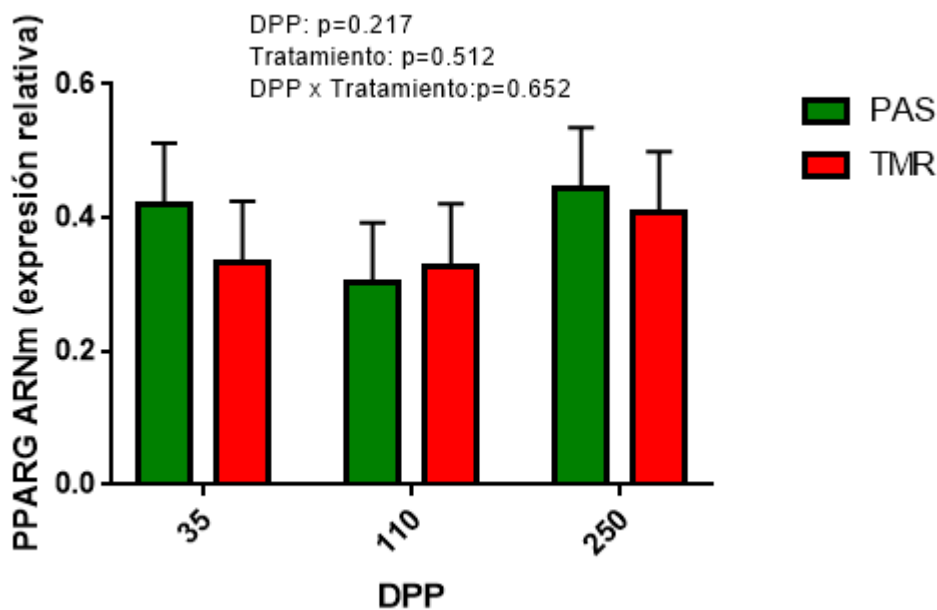


Fig.19 Expresión relativa del del regulador maestro receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma. Expresión normalizada de PPARG, para ambos grupos TMR y PAS, durante las tres fechas 35, 110, 250 DPP. Gráfico de barras presenta valor de media \pm error estándar.

También se estudió la expresión del receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma o PPARG por sus siglas en inglés, un regulador maestro del metabolismo.

No se encontraron efectos de la dieta, ni de fecha en la expresión de este factor de transcripción

5. Discusión

La expresión de los genes claves de la gluconeogénesis estudiados mostraron estar afectados por el momento de lactancia, en particular durante la lactancia temprana, etapa donde la vía se ve altamente exigida para atender la gran demanda de la lactogénesis para sostener la producción de leche. Las tres enzimas estudiadas, PC, PEPCK y G6PC mantuvieron una correlación positiva durante la curva de lactancia, lo que sugiere que esta vía se encuentra regulada.

Se encontró una correlación negativa entre los niveles de glucógeno en hígado, y las enzimas PC y PEPCK ($r=-0,28, p=0.03$, $r=-0.37, p=0.005$), estos resultados sugieren que las mismas señales que promueven la glucogenólisis, son las opuestas a las señales que promueven la gluconeogénesis. Esto último depende fundamentalmente de la insulina, y el glucagón. (27)

La ausencia de correlación entre glucógeno y G6PC, puede explicarse por el rol que tiene esta enzima en la glucogenólisis, catalizando el último paso de dicha vía.

La mayor expresión relativa de PC en vacas del grupo PAS con respecto al grupo TMR, puede explicarse por la necesidad de un mayor uso de sustratos gluconeogénicos alternativos como lactato y aminoácidos, que forman piruvato, el uso de estos sustratos requiere de la PC para transformarse en oxalacetato y luego entrar o no en la gluconeogénesis a través de PEPCK. El motivo por el que las vacas del grupo TMR no requieren del uso de estos sustratos alternativos, se debe a que las dietas TMR tienen un mayor contenido almidonoso que se traduce en una mayor cantidad de propionato debido a las características de la fermentación ruminal. El ingreso del propionato a la vía gluconeogénica no requiere el uso de PC, sino que ingresa formando succinil-CoA. Se estima que dietas basadas en pastura al fermentarse en el rumen generan un 20% de propionato en relación a los AGV, mientras que dietas basadas en granos como la TMR, generan cuando son fermentadas en el rumen un 40% de propionato en relación a los AGV totales. (29) Adicionalmente las vacas del grupo de pastura, realizan una mayor movilización de reservas lipídicas para satisfacer la demanda energética durante la lactancia temprana, por lo tanto la mayor expresión de PC en el grupo de pastura puede asociarse también a una mayor concentración de acetil coA en hígado, el acetil coA ha sido reportado como un coactivador de esta enzima y como una molécula capaz de favorecer la transcripción de PC. (30)

En cuanto a los resultados encontrados a PEPCK el efecto encontrada para la dieta no se ve en la lactancia temprana, donde ambos grupos tienen niveles similares de expresión, sino que se ve en la magnitud de la baja en la expresión donde las vacas del grupo PAS tienen

una expresión más elevada con respecto a aquellas del grupo TMR. Esta diferencia puede deberse a que las vacas del grupo de pastura deben realizar un mayor esfuerzo metabólico en pos de recuperar condición corporal por una mayor movilización durante la lactancia temprana.

Los resultados obtenidos para los niveles de expresión de G6PC, concuerdan con lo reportado por distintos autores, donde se observa un aumento en la expresión durante la lactancia temprana.(31) La ausencia de cambios en el nivel de expresión de G6PC durante lactancia media, y lactancia tardía también ha sido reportada (31), si bien se podría esperar un aumento en los niveles de expresión durante la lactancia tardía dirigida a disponibilizar glucosa libre para otros tejidos con el fin de ser utilizada como combustible para la recomposición de reservas, esto no sucedió. Estos datos sugieren una posible regulación a nivel post transcripcional de esta enzima.

Los niveles de expresión de PC,PEPCK, y G6PC no correlacionaron con la producción de leche, lo que indica que la gluconeogénesis no determina directamente la capacidad de producción de la vaca, sino que existen otros factores involucrados. (27)

Adicionalmente, tampoco se encontró relación entre los niveles de expresión de estas tres enzimas, con los niveles de glucosa libre en hígado, ni con la glucosa en sangre, mientras que si se encontró correlación entre la glucosa libre en hígado con los niveles de glucógeno ($r = -0.42$, $P < 0.05$) para la fecha 35 DPP. Sugiriendo que la glucosa libre hepática puede estar más relacionada a la movilización de reservas de glucógeno y no a la síntesis de glucosa, especialmente en lactancia temprana.

No se encontró correlación entre los niveles de expresión del receptor de leptina, ni de la leptina, con la activación de AMPK. Los efectos de la leptina en la homeostasis de la glucosa en el hígado aún no ha sido comprendida en su totalidad, distintos autores han encontrado resultados opuestos, se ha reportado efectos potenciadores y supresores de la gluconeogénesis, así como para la glucogenolisis. El efecto de la leptina es complejo y está fuertemente influenciada por el estatus metabólico, el ambiente, además de una relación con el sistema nervioso. (32)

Tampoco se encontró correlación entre los niveles de expresión del receptor de adiponectina, ni de la adiponectina con la activación de AMPK. Los resultados sugieren un desacople entre ADIPOR1 y la posterior activación de AMPK. ADIPOR1 no es capaz de activar AMPK, por lo que no se da la inhibición de la gluconeogénesis. Indagando más sobre este resultado, se han reportado casos de resistencia a la adiponectina en los tejidos periféricos en modelos de ratones obesos. Ratones obesos y con diabetes tipo 2 han mostrado una estimulación mucho más débil de la vía de señalización de AMPK por ADIPOR1 en tejido muscular. Por otro lado, no se encontró correlación entre los niveles de

adiponectina con su receptor, lo que enfatiza/refuerza la hipótesis de una desregulación de esta hormona.(33-36)

Teniendo en cuenta estos datos surge una especie de resistencia a la adiponectina. Dos posibles hipótesis sobre lo que sucede, pareciera existir un desacople entre la cantidad de ARNm con la cantidad de traducción del receptor, es decir que podría existir algún mecanismo de regulación post transcripcional. Estos resultados coinciden con los reportados por otros autores (33), que indican que la resistencia a la adiponectina es independiente del nivel de la cantidad de transcrito del receptor de adiponectina tipo 1.

Distintos mecanismos han sido propuestos para explicar lo que sucede a nivel molecular con ADIPOR1, un de los mecanismos se basa en lo que ocurre en modelos de obesidad, cuando el receptor ADIPOR1 se traduce de forma normal, pero existe un mecanismo de bloqueo de la señalización a través del correceptor APPL2(37).Lo que bloquea la vía de señalización y los efectos downstream.

Ratones knockout para el receptor de insulina, también han mostrado un desacople entre la adiponectina y la activación de AMPK en hepatocitos. Este desacople termina por inhibir los efectos downstream en la vía de señalización de AMPK, llevando a una desregulación en el metabolismo de ácidos grasos, y de la glucosa.(38) Si bien las vacas lecheras poseen un receptor de insulina funcional, recientemente se ha reportado que hacia el final de la gestación y durante la lactancia temprana, existe una resistencia a la insulina (39). Los resultados obtenidos en conjunto con lo reportado por la bibliografía para otros modelos animales, sugieren una posible interacción entre la resistencia a insulina, la resistencia a adiponectina y el desacople de la vía de señalización de AMPK, en el modelo de vaca lechera.

A su vez se observó un efecto de inhibición en la expresión de PC por parte de la vía de señalización de AMPK para la fecha 35 DPP. En esta fecha se observa un aumento en el coeficiente de AMPKp/AMPK total, posiblemente asociado al estrés metabólico asociado a la alta demanda energética asociada a la lactancia temprana. La activación de AMPK, causa la inhibición de procesos que consumen ATP, la gluconeogénesis es uno de los procesos inhibidos por AMPK en distintos modelos como el murino o el humano. La inhibición de la gluconeogénesis en estos modelos se da mediante la inhibición de otras enzimas como PEPCK y G6PC. Los resultados obtenidos que muestran una inhibición a nivel de expresión de PC, lo que sugiere un mecanismo de acción de la vía de señalización de AMPK sobre la inhibición de la vía gluconeogénica distinto para el modelo estudiado. Se hipotetiza que esto sucede en rumiantes ya que el pasaje de piruvato a oxalacetato requiere de ATP, lo que es altamente ineficiente energéticamente. El metabolismo en el rumiante priorizará el ingreso de propionato como principal precursor gluconeogénico siempre que este disponible, ya que este es más eficiente en su entrada (no requiere ATP). El hecho que

se inhiba únicamente en PC le permite continuar produciendo glucosa endógena, necesaria no solo para la producción de leche, sino para su propia fisiología.

6. Conclusiones y trabajo a futuro.

En suma, este trabajo presenta información sobre la expresión y regulación de la gluconeogénesis durante la curva de lactancia en vacas con distintas estrategias de alimentación. Se determinaron los niveles de glucosa libre y glucógeno hepático, y sus cambios asociados a los requerimientos energéticos. Se estudió la fosforilación de la AMPK y se realizó una aproximación a nivel molecular sobre los cambios en la expresión de enzimas involucradas en la gluconeogénesis, y su relación con la vía de señalización de AMPK. En relación a esto último se presentó información inédita para este modelo, tanto con lo que sucede a nivel upstream o de activación de la vía, como con lo que sucede a nivel downstream y su impacto en la vía gluconeogénica.

Los resultados obtenidos indican que:

- La composición hepática de glucosa y glucógeno se encuentra afectada por la fecha relativa al parto, observándose una movilización de glucógeno durante la lactancia temprana, y una posterior recomposición de esta reserva.
- La estrategia de alimentación afecta la concentración hepática de glucógeno, encontrándose mayores reservas de glucógeno para las vacas alimentadas con TMR.
- Existe una mayor proporción de AMPK_p durante la lactancia temprana. La estrategia de alimentación no influye en el grado de fosforilación de AMPK.
- La vía de señalización de AMPK actúa inhibiendo a la enzima piruvato carboxilasa, hecho que no se encuentra reportado en la bibliografía. Se atribuye esto a una forma de ahorrar ATP.
- La activación de AMPK se encuentra desacoplada en relación a los niveles de ARNm de los receptores de leptina y adiponectina.
- Los niveles de expresión génica de los receptores de leptina y adiponectina y las enzimas claves de la gluconeogénesis disminuyeron a los 110 DPP en comparación con 35 y 250 DPP. Esto tiene sentido en tanto durante lactancia temprana, y lactancia tardía la demanda de glucosa es mayor, debido a una gran demanda para la producción de leche como para la recomposición de reservas y demanda del feto respectivamente.
- Los niveles de expresión de PC y PEPCK se encuentran regulados, y mantienen un equilibrio entre sí que permiten balancear los procesos anabólicos y catabólicos.

- La expresión de PC se ve afectada por la interacción entre la fecha y la estrategia de alimentación, siendo más alta para Pas que para TMR durante 35 DPP, el uso diferencial de sustratos puede ser una causa que explique este fenómeno.
- Los niveles de expresión de PEPCK, se ven afectados por la estrategia de alimentación, lo que puede estar explicado por un mayor esfuerzo metabólico por parte de las vacas alimentadas en base a pastura, para lograr recomponer reservas.

A futuro se debe profundizar sobre lo que sucede a nivel upstream con la activación de la vía de señalización de AMPK, para esto se debe profundizar en el estudio de los receptores de adiponectina y leptina, no sólo a nivel transcripcional, sino que se debe ver que está sucediendo la traducción de estos genes, una estrategia sugerida es el estudio por western blot.

Otro aspecto a estudiar a futuro es la actividad de las tres enzimas involucradas en la gluconeogénesis, estos datos nos permitirán complementar los datos obtenidos sobre los niveles de expresión. Se sabe por bibliografía que la actividad de estas enzimas esta sujeta a reguladores alostéricos (40), por lo que es de especial interés profundizar sobre esto.

También esperamos aportar información sobre los mecanismos subyacentes a la producción de glucosa en el hígado para poder generar estrategias que permitan un mejor uso de los recursos y contribuir a la productividad del sistema. Como resultado más ambicioso intentaremos aportar información de las estrategias de alimentación que más se adecúan a la realidad de nuestro país.

7. Referencias Bibliográficas.

1. Transforma Uruguay. [Internet] Hoja de ruta en Ciencia, tecnología e Innovación para el sector alimentario del Uruguay, Sector lechero; Noviembre. 2018 [Citado 2019 Agosto]. Disponible desde:
<https://www.transformauruguay.gub.uy/es/documentos/sector-lacteo.pdf>
2. Astessiano, A. L., Meikle, A., Chilbroste, P., Mattiauda, D. A., Fajardo, M., & Carriquiry, M. Metabolic Adaptations Due to the Inclusion of Pasture in the Diet of Dairy Cows Fed Total Mixed Ration during Early Lactation. *Open Journal of Animal Sciences*, 2017. 7(02), 127..
3. Chilbroste P.. Análisis Competitividad Cadena Láctea Uruguaya. Trabajo presentado en: Foro INALE 2018; Diciembre 2018; Montevideo
4. Artagaveytia J.. Competitividad en los tambos uruguayos. Trabajo presentado en: Jornada técnica lechera 2017. Julio 2017. Colonia
5. Otrowski B., Deblitz C. .. La competitividad en producción lechera de los países de Chile, Argentina, Uruguay y Brasil.). Livestock Policy Discussion Paper. FAO. (2001) N°4.
6. INTA Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. Evaluación productivo-económica de dietas basadas en “TMRs vs. PMRs”. Sistemas de producción. Resultados de investigación lechera. Agosto. 2011. [Citado 2019 Agosto]. Disponible desde: https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-ficha_22-evaluacin_productivo-econmica_de_dietas.pdf
7. Jim Linn. Feeding total mixed rations. [Internet] University of Minnesota Extension; 2018. [Citado 2019 Agosto]. Disponible desde:
<https://extension.umn.edu/dairy-nutrition/feeding-total-mixed-rations> .
8. Astessiano AL, Meikle A, Fajardo M, Gil J, Mattiauda DA, Chilbroste P, Carriquiry M. Metabolic and endocrine profiles and hepatic gene expression of Holstein cows fed total mixed ration or pasture with different grazing strategies during early lactation. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2015;57(1).
9. Drackley, J. K. Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier?. 1999 *Journal of dairy science*, 82(11), 2259-2273.
10. Bell, A. W., & Bauman, D. E. Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 1997 2(3), 265-278.
11. Galvis, Rubén D, Múnera, Edwin A, & Marín, Andres M. Relación entre el mérito genético para la producción de leche y el desempeño metabólico y reproductivo en la vaca de alta producción. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 2005 18(3), 228-239.

12. van Hoeij, R.. *Metabolic status, lactation persistency, and udder health of dairy cows after different dry period lengths*. [tesis de doctorado] Wageningen, Wageningen University.2017
13. Donkin, S. S. (2016). Control of hepatic gluconeogenesis during the transition period. Trabajo presentado en: Florida Ruminant Nutrition Symposium 27th Annual Meeting.2016;Florida
14. Larsen, M., & Kristensen, N. B. Precursors for liver gluconeogenesis in periparturient dairy cows. *Animal*, (2013). 7(10), 1640-1650.
15. Larsen, M., & Kristensen, N. B. Effect of abomasal glucose infusion on splanchnic amino acid metabolism in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*, (2009).92(7), 3306-3318.
16. Reynolds, C.K. Glucose Balance in Cattle. Trabajo presentado en:Florida Ruminant Nutrition Symposium 16th Annual Meeting.2005;Florida
17. Aschenbach, J. R., Kristensen, N. B., Donkin, S. S., Hammon, H. M., & Penner, G. B. Gluconeogenesis in dairy cows: the secret of making sweet milk from sour dough. *IUBMB life*, 2010. 62(12), 869-877.
18. Doepel, L., Lobley, G. E., Bernier, J. F., Dubreuil, P., & Lapierre, H. Differences in splanchnic metabolism between late gestation and early lactation dairy cows. *Journal of dairy science*, 2009. 92(7), 3233-3243.
19. Reid, I. M., Roberts, C. J., & Baird, G. D. The effects of underfeeding during pregnancy and lactation on structure and chemistry of bovine liver and muscle. *The Journal of Agricultural Science*, (1980). 94(1), 239-245.
20. Smith, R. W., & Walsh, A. Effects of pregnancy and lactation on the activities in sheep liver of some enzymes of glucose metabolism. *The Journal of Agricultural Science*, (1982). 98(3), 563-565.
21. Lim, C. T., Kola, B., & Korbonits, M.. AMPK as a mediator of hormonal signalling. *Journal of molecular endocrinology*, 2010 44(2), 87.
22. Combs, T. P., & Marliss, E. B.. Adiponectin signaling in the liver. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 2014,15(2), 137-147.
23. Hardie, D. G., & Alessi, D. R. . LKB1 and AMPK and the cancer-metabolism link-ten years after. *BMC biology*, 201311(1), 36.)
24. Hardie, D. G. . Keeping the home fires burning: AMP-activated protein kinase. *Journal of the Royal Society Interface*, 2018,15(138), 20170774.
25. Carriquiry, M., Weber, W. J., Fahrenkrug, S. C., & Crooker, B. A. . Hepatic gene expression in multiparous Holstein cows treated with bovine somatotropin and fed n-3 fatty acids in early lactation. *Journal of Dairy Science*, 2009,92(10), 4889-4900.
26. Astessiano, A. L., Carriquiry, M., Mattiauda, D. A., Adrien, M. L., Chilbroste, P., & Meikle, A. . Endometrial gene expression in primiparous dairy cows at the end of the voluntary waiting period is affected by nutrition: Total mixed ration vs increasing levels of herbage allowance. *Reproduction in Domestic Animals*, 2017,52(5), 798-805.

27. García-Roche, M., Casal, A., Mattiauda, D. A., Ceriani, M., Jasinsky, A., Mastrogiovanni, M. & Quijano, C. . Impaired hepatic mitochondrial function during early lactation in dairy cows: Association with protein lysine acetylation. *PLoS one*, 2019,14(3), e0213780.
28. Greenfield, R. B., Cecava, M. J., & Donkin, S. S. . Changes in mRNA expression for gluconeogenic enzymes in liver of dairy cattle during the transition to lactation. *Journal of Dairy Science*, 2000 83(6), 1228-1236
29. Zhang, Qian, "Propionate induces gluconeogenesis in dairy cattle through direct activation of the bovine cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase gene promoter"). Open Access Dissertations. 2015 606.
30. Murondoti, A., Jorritsma, R., Beynen, A. C., Wensing, T., & Geelen, M. J.. *Activities of the enzymes of hepatic gluconeogenesis in periparturient dairy cows with induced fatty liver. Journal of Dairy Research*, 2004,71(2), 129–134.
31. Ostrowska, M., Górká, B. Ž., Słoniewski, K., & Kowalski, L. Z. Expression of PC, PCK1, PCK2, LDHB, FBP1 and G6PC genes in the liver of cows in the transition from pregnancy to lactation. *Animal Science Papers and Reports*, 2013,31(4), 281-290.
32. Reist, M., Erdin, D., Von Euw, D., Tschuemperlin, K., Delavaud, C., Chilliard, Y., & Künzi, N. Concentrate feeding strategy in lactating dairy cows: metabolic and endocrine changes with emphasis on leptin. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 2003,44(1), P30..
33. Capeau, J. The story of adiponectin and its receptors AdipoR1 and R2: to follow. *Journal of hepatology*, 2007,47(5), 736-738.
34. Mullen, K. L., Smith, A. C., Junkin, K. A., & Dyck, D. J.. Globular adiponectin resistance develops independently of impaired insulin-stimulated glucose transport in soleus muscle from high-fat-fed rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2007, 293(1), E83-E90.
35. Ruderman, N. B., Carling, D., Prentki, M., & Cacicedo, J. M. AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *The Journal of clinical investigation*, 2013,123(7), 2764-2772.
36. Kadowaki, T., Yamauchi, T., Kubota, N., Hara, K., Ueki, K., & Tobe, K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *The Journal of clinical investigation*, 2006,116(7), 1784-1792.
37. Engin, A. Adiponectin-Resistance in Obesity. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2017,415–441. doi:10.1007/978-3-319-48382-5_18.
38. Lin, H. V., Kim, J. Y., Poci, A., Rossetti, L., Shapiro, L., Scherer, P. E., & Accili, D. Adiponectin resistance exacerbates insulin resistance in insulin receptor transgenic/knockout mice. *Diabetes*, 2007,56(8), 1969-1976.
39. De Koster, J. D., & Opsomer, G. Insulin resistance in dairy cows. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 2013,29(2), 299-322.

40. Velez J, Donkin S. Feed Restriction Induces Pyruvate Carboxylase but not Phosphoenolpyruvate Carboxykinase in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*. 2005;88(8):2938–2948.